

**Zur Kennzeichnung natürlicher
Huminsäuren**

Hans-Elmar Bisle

Zur Kennzeichnung natürlicher Huminsäuren

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München



vorgelegt

von

Hans-Elmar Bisle

aus

Bremerhaven

Juli 1959

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. W. Souci
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. B a m a n n
- Tag der mündlichen Prüfung:

18. Nov. 1959

Die vorliegende Arbeit wurde an der Chemischen Abteilung des Balneologischen Instituts bei der Universität München und der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in München in der Zeit von August 1955 bis Februar 1959 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. S. W. S o u c i , Direktor der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie und Vorstand der Chemischen Abteilung des Balneologischen Instituts, darf ich an dieser Stelle für die Anregung der Arbeit sowie für die verständnisvolle Förderung besonders danken.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich ebenfalls Herrn Dr. G. S o m m e r von der Chemischen Abteilung des Balneologischen Instituts, der meine Arbeit durch wertvolle Ratschläge unterstützt hat.

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

<u>A. Einführung</u>	1
--------------------------------	---

B. Gewinnung von Huminsäuren aus verschiedenem Ausgangsmaterial

1) Isolierung	3
2) Reinigung	4
3) Prüfung auf Reinheit und Einheitlichkeit	5

C. Versuche zur Gewinnung einheitlicher Fraktionen

1) Fraktionierung durch Alkohol	9
2) Fraktionierung durch Elektrophorese	9
3) Fraktionierung durch Chromatographie	10
4) Fraktionierung durch partielle Flockung	12

D. Eigenschaften der Huminsäuren und Huminsäurefraktionen

1) Zusammensetzung	16
2) Strahlenabsorption im UV und sichtbaren Bereich	17
3) Strahlenabsorption im Infrarot	19
4) Flockbarkeit	23

<u>E. Methodischer Teil</u>	25
---------------------------------------	----

<u>F. Schrifttum</u>	32
--------------------------------	----

<u>G. Anhang: Tabellen und Abbildungen</u>	I
--	---

A. Einführung

Über die Chemie der Huminsäuren ist ein umfangreiches Schrifttum entstanden, das diese Stoffgruppe unter verschiedenen Aspekten beleuchtet. Geologische, mikrobiologische, agrikulturchemische, torftechnologische und medizinisch-physiologische Fragestellungen waren hierbei richtungweisend. Die früheren Arbeiten befassen sich sowohl mit jenen Huminsäuren, die als Bestandteile der Böden, der Torfe, der Braunkohlen und anderer Humifizierungsprodukte in der Natur weit verbreitet sind als auch mit künstlich gewonnenen Substanzen. Diese entstehen beispielsweise bei der Eiweißhydrolyse oder bei der Einwirkung von Säuren oder Alkalien auf definierte Ausgangsstoffe und werden ebenfalls mit dem Namen "Huminsäuren" belegt, obwohl sie mit dem natürlichen Vorbild oft nur wenig gemein haben.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich ausschließlich mit den natürlichen Huminsäuren. Innerhalb der in der Natur durch Zersetzung vorwiegend pflanzlichen Ausgangsmaterials entstehenden Huminstoffe nehmen diese Verbindungen einen wichtigen Platz ein. Sie sind ein Glied in einer praktisch stufenlosen Reihe von Humifizierungsprodukten und verkörpern dem Anschein nach ein kompliziertes Gemisch mehrerer, einander chemisch nahestehender Verbindungen. Sie sind wahrscheinlich nach einem gemeinsamen Prinzip aufgebaut und es war bisher nicht möglich, sie analytisch oder auch hinsichtlich ihres Aufbaues von anderen Humifizierungsprodukten genügend scharf abzugrenzen. Definitionsgemäß unterscheiden sie sich durch ihre Löslichkeit in Alkalien unter Salzbildung und ihre Fällbarkeit durch Mineralsäuren von den beiden anderen großen Humus-Stoffgruppen, den alkalilöslichen "Huminen" und den alkalilöslichen, nicht säurefällbaren "Fulvosäuren".

Frisch gefällte Huminsäuren bilden im feuchten Zustand eine dunkelbraune, gallertige Masse, die infolge ihres hohen Quel-

lungsgrades sehr voluminös erscheint, ein hohes Sorptionsvermögen und die Fähigkeit des Basenaustausches besitzt. Beim Trocknen schrumpft sie stark zusammen und zerfällt schließlich in amorphe, glänzendbraunschwarze Krümel von muscheligem Bruch.

Über das Molekular- und Äquivalentgewicht der Huminsäuren liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor, doch weichen die nach verschiedenen Methoden gewonnenen Ergebnisse zum Teil stark voneinander ab. Für das Molekulargewicht werden Werte bis 100 000 und für das Äquivalentgewicht von 100 bis 345 genannt.

Bei dieser Situation müssen die Bestrebungen der Humusforschung in erster Linie dahin gehen, die Huminsäurepräparate in möglichst reiner Form - also unter weitgehender Befreiung von anderen Humifizierungsprodukten und sonstigen Verunreinigungen und nach Möglichkeit unter Vermeidung sekundärer Umwandlungen - zu gewinnen und die erhaltenen Substanzgemische in einheitliche Fraktionen zu zerlegen. Nur anhand wohldefinierter, einheitlicher und möglichst reiner Huminsäurepräparate bzw. -fraktionen erscheinen weitere Untersuchungen sinnvoll. Die Verschiedenheit vieler Ergebnisse im Schrifttum findet durch die Uneinheitlichkeit der verwendeten Substanzen teilweise ihre Erklärung.

In Anbetracht der Schwierigkeiten, die sich einem tieferen Eindringen in die Struktur der Huminsäuren und der Aufklärung der Eigenschaften und der Wirkungsweise entgegenstellen, ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die methodischen Möglichkeiten der Reindarstellung und der Fraktionierung der Huminsäuren zu untersuchen und die erhaltenen Produkte hinsichtlich Zusammensetzung und Eigenschaften zu charakterisieren.

B. Gewinnung von Huminsäuren aus verschiedenem Ausgangsmaterial

Das Ausgangsmaterial für die vorliegenden Untersuchungen bildeten verschiedene botanisch definierte Torfarten, ferner Braunkohle (Kasseler Braun) und vermodertes Holz (Tab. 1). Die Proben waren zumeist luftgetrocknet, verschiedentlich kamen auch naturfeuchte Torfe zur Anwendung.

1) Isolierung

Die Proben wurden zunächst über Nacht mit 5%iger Salzsäure behandelt, um salzartig bzw. sorptiv gebunden vorliegende Huminsäuren der nachfolgenden Extraktion zugänglich zu machen. Gleichzeitig diente die Behandlung dazu, säurelösliche anorganische und organische Stoffe zu entfernen. Eine anderweitige Vorbehandlung mit stärkeren Säuren, Lipoidlösungsmitteln o. ä. zur Entfernung von Nichthuminstoffen bzw. Bitumen unterblieb, weil hierbei nach den bisherigen Erfahrungen mit Strukturveränderungen von Torfbestandteilen gerechnet werden mußte.

Von den zahlreichen Mitteln, die schon zur Extraktion von Huminsäuren eingesetzt worden sind (22,1), haben sich nur wenige behauptet. Vorzugsweise verwendet man gegenwärtig Lösungen von 0,5%iger Natronlauge, 2%igem Natriumfluorid und 0,1 m Natriumdiphosphat (Na-pyrophosphat). Vergleichbare Ergebnisse über erzielte Ausbeuten sind jedoch kaum bekannt.

Um die Untersuchungsbasis möglichst breit zu gestalten, erfolgte die Extraktion jedes Ausgangsstoffes mit den erwähnten drei Lösungsmitteln, ferner mit Natriumcarbonatlösung bei p_H 7,5. Da bei größeren Ansätzen stets mit vermehrten Fehlerquellen zu rechnen ist, andererseits eindeutige Vergleichsmöglichkeiten erwünscht waren, wurden die Ausbeuten - getrennt von der präparativen Aufarbeitung - in analytischen Ansätzen durch fünfmalige Extraktion bestimmt.

Wie die in Tab. 2 wiedergegebenen Ergebnisse belegen, nehmen die Ausbeuten in der Reihenfolge Natronlauge > Diphosphat > Fluorid ab. In gleicher Reihenfolge vermindert sich auch die OH-Ionen-Konzentration, was die bedeutsame Rolle unterstreicht, die dem p_H -Wert bei der Extraktion hinsichtlich der erzielbaren Ausbeuten zukommt.

Die Fluorid- und Diphosphatauszüge enthielten teilweise nur sehr geringe Mengen an Huminsäuren. Die Extraktionsrückstände wurden deshalb noch mit 0,5%iger Natronlauge behandelt, um die restlichen Huminsäuren zu erfassen. Die so erhaltenen zwei Fraktionen aus dem gleichen Ausgangsmaterial kamen dann getrennt zur weiteren Untersuchung.

2) Reinigung

Es wurde bereits erwähnt, daß die ausgefällten Huminsäuren verschiedenartige Begleitstoffe enthalten können, die teils infolge ihres annähernd gleichen Verhaltens, teils durch Sorption in den Niederschlag gelangen können. Dabei handelt es sich in erster Linie um Polysaccharide und deren Oxydationsprodukte, primäre Rotteprodukte des Lignins und bituminöse Stoffe.

Mit der Reinigung von Huminsäurepräparaten befassen sich zahlreiche Abhandlungen, wobei sich die beschriebene Arbeitsweise aber oft nur auf die Gewinnung einer bestimmten Huminsäurefraktion konzentriert. Aus der Vielzahl der Methoden seien als wichtigste Beispiele genannt:

wiederholte Umfällung (12,17), Behandlung mit Äther (22), Alkohol (4), Benzol-Alkohol-Gemisch (29), Salzsäure (22), Acetylbromid (9,24).

Manche Verfahren erscheinen aber im Hinblick auf mögliche strukturelle Veränderungen der Huminsäuren nicht unbedenklich.

Die in dieser Arbeit verwendeten Präparate wurden grundsätzlich umgefällt, um sie von Extraktionsmittelrückständen weitgehend zu befreien und den Aschegehalt zu verringern.

Zu der Behandlung mit Salzsäure berichtet Forsyth (3), daß erste Fällungen von Huminsäuren aus alkalischen Hochmoortorf-extrakten bis zu 35 % hydrolysierbare Stoffe, davon allein 8,3 %

Hemizellulosen, enthielten.

Eigene Versuche ergaben nach dreistündiger Behandlung mit siedender 2%iger Salzsäure bei Huminsäuren aus Zwischenmoortorf (IV) einen hydrolysierten organischen Anteil von 14,8 %. Es muß jedoch bezweifelt werden, ob die hydrolysierbaren Stoffe generell als Verunreinigungen angesprochen werden können. Bei dem Huminsäurepräparat Riedel de Haën (X) erhöhte sich beispielsweise der Anteil an hydrolysierten Stoffen nach dem Umfällen von ursprünglich 6,1 auf 9,0 %. Dieser Zuwachs dürfte in erster Linie auf Abbauprodukte der Huminsäuren zurückzuführen sein.

Eingehend untersucht wurde auch die vielfach empfohlene "Reinigung" mit Alkohol. Die hierbei in Lösung gehenden Anteile werden vielfach mit den löslichen Anteilen anderer Reinigungsverfahren identifiziert, ohne daß bekannt ist, ob die auf so verschiedene Weise abgetrennten Bestandteile bzw. Verunreinigungen des Huminsäurekomplexes wenigstens mengenmäßig übereinstimmen. Die Löslichkeit der Huminsäuren in Alkohol wurde deshalb mit der Löslichkeit in Salzsäure und der Beständigkeit gegen Acetylbromid, die als Maß für den Grad an organischen Verunreinigungen gilt, verglichen. Zu diesem Zweck wurde ein Huminsäurepräparat nacheinander mit den erwähnten Mitteln behandelt und zwar dreimal in jeweils anderer Reihenfolge.

Erwartungsgemäß sollte die Reihenfolge der Behandlungen belanglos sein und in jedem Fall zu dem gleichen Ergebnis führen. Wie aus dem angegebenen Schema (Abb. 1) hervorgeht, ist dies jedoch nicht der Fall. Die eingangs erwähnten Bedenken finden hierdurch ihre Bestätigung und mithin sind auch die experimentell nachgeprüften Methoden für eine schonende Reinigung der Präparate nicht geeignet. Sie können jedoch zur Kennzeichnung oder Fraktionierung der Huminsäuren ein brauchbares Mittel darstellen.

3) Prüfung auf Reinheit und Einheitlichkeit

Die Darstellung eines Präparates wird üblicherweise mit der Feststellung der Ausbeute und seiner Eigenschaften, insbesondere seiner Reinheit bzw. Einheitlichkeit abgeschlossen. Solange aber - wie im Falle der Huminsäuren - keine eindeutigen Reinheitskriterien

gegeben sind, wird man sich mit der Beschreibung erfaßbarer Eigenschaften behelfen müssen.

Huminsäuren sind bekanntlich organischer Natur und der stets vorhandene Gehalt an Wasser und Mineralstoffen (Tab. 3) stellt in diesem Sinne eine Verunreinigung der Präparate dar, die für Bezugswerte in Abzug gebracht werden muß. Es ist zwar möglich, Huminsäuren wasserfrei darzustellen, doch ist es bis heute noch nicht gelungen, sie frei von mineralischen Bestandteilen zu erhalten. Dieser Anteil beträgt mitunter bis zu einem Drittel, ohne daß es möglich ist, ihn durch wiederholtes Umfällen nennenswert zu erniedrigen (17,12). Es muß angenommen werden, daß die am häufigsten enthaltenen Elemente Eisen, Aluminium, Calcium, Magnesium und das Silikat zumindest teilweise komplex im Molekül verankert sind.

Die vielfach zur Reinheitsprüfung herangezogene Behandlung der Huminsäuren mit Acetylbromid - neuerdings wird auch Acetylsulfat vorgeschlagen (28) - wurde schon erwähnt. Wie sich an isolierten Substanzen nachweisen läßt, gehen Zellulose, Hemizellulosen, Wachse, Harze u. ä. Stoffe bei mehrtägiger Einwirkung in wasserlösliche Verbindungen über. Humifizierungsprodukte fortgeschrittenen Stadiums verbleiben dagegen ungelöst, werden allerdings weitgehend verändert. Wenngleich die Beständigkeit gegen Acetylbromid auch keine definitiven Rückschlüsse auf den Gehalt an organischen Verunreinigungen zuläßt, kann doch die Kenntnis des in Acetylbromid unlöslichen Rückstandes der Huminsäuren nutzbringende Hinweise auf Alter, zweckmäßige Gewinnung und weitere Behandlung geben.

Wertvolle Kennzahlen zum Vergleich verschiedener Präparate liefern auch die Elementaranalyse und die Bestimmung des Gehaltes an funktionellen Gruppen. Ihre Behandlung sei jedoch einem späteren Abschnitt vorbehalten.

Präzisere Aussagen, als die konventionellen Mittel bieten können, ließ die Anwendung der neueren Verteilungsmethoden - Elektrophorese, Chromatographie, Ionenaustausch - erhoffen. Besonders bewährt hat sich vor allem die Papierelektrophorese (29, 18), die bei verhältnismäßig geringem Aufwand zu recht detaillierten Aussagen führt. Beispielsweise zeigt der Elektrophoresestrei-

fen (Pherogramm) eines mit Natronlauge aus Moorerde (VII) isolierten Huminsäurepräparats im Tages- und im UV-Licht vier verschiedene Zonen (Abb. 2).

Vom Auftragsort weg in Richtung Anode erstreckt sich eine nur im UV-Licht sichtbare, fluoreszierende Zone (A), die von einem gezackten, schmalen, schwarzen Band (B) begrenzt wird. In größerem Abstand folgt eine etwas verschmierte, breite, braune Zone (C), an die sich eine nur im UV-Licht wahrnehmbare, hell fluoreszierende Zone (D) anschließt. Bei den beiden im Tageslicht sichtbaren Zonen B und C handelt es sich offensichtlich um zwei Huminsäuretypen, denen Springer bereits früher bei Farbmessungen von Humatlösungen verschiedener Herkunft begegnet war (24) und die von ihm später auf Grund des Farbtons ihrer Lösungen als Grau- und Braunhuminsäuren bezeichnet wurden (25,26). Zone B wird demnach von Grauhuminsäuren, Zone C von Braunhuminsäuren gebildet. Die Natur der Zonen A und D ist noch unbekannt.

Huminsäuren aus verschiedenem Ausgangsmaterial weisen in ihren Pherogrammen markante Unterschiede auf. Schematisch wird dies an einigen Beispielen veranschaulicht (Abb. 3), wobei insbesondere der stark wechselnde Gehalt an Grauhuminsäuren (Zone B) ins Auge fällt. Soweit sich die Verhältnisse anhand des Untersuchungsmaterials übersehen lassen, scheinen Grauhuminsäuren in reinen Hochmoortorfen und in Braunkohlen vom Typ des Kasseler Brauns nicht vorzukommen.

Auch die Zone A ist nicht auf allen Pherogrammen vertreten. Sie weist überdies Fluoreszenznuancen zwischen gelblich und intensiv orange auf, wobei es zweifelhaft bleibt, ob es sich um Konzentrationsunterschiede oder um verschiedenartige Stoffe von vielleicht ähnlicher Konstitution handelt. Andere Beobachtungen deuten darauf hin, daß durch Reste der schwarz bzw. braun gefärbten Fraktionen, die während der Elektrophorese liegen bleiben, eine Farbänderung der an sich gelb fluoreszierenden Zone zu einer orangen Mischfarbe verursacht wird. Bei Hochmoortorfhuminsäuren ist diese Zone nicht oder nur schwach ausgeprägt, so daß man sie auch mit dem Mineralstoffgehalt des Ausgangsmaterials in Zusammenhang bringen könnte. Das Pherogramm der - besser als Humoligninsäuren bezeich-

neten (vgl. Abschnitt D 2) - Extrakte aus Holzmoder (VIII) kann man bei dieser Betrachtung mit einiger Berechtigung ausklammern, weil hier die Zone A im Farbton und in der Wanderungsgeschwindigkeit offensichtlich aus dem Rahmen fällt. Die Zonen D und C der Huminsäuren verschiedener Herkunft lassen keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Weiter läßt sich durch die Elektrophorese zeigen, daß den verschiedenen Extraktionsmitteln selektive Lösungseigenschaften zukommen, wie am Beispiel der aus Moorerde (VII) mit Natronlauge, Diphosphat- und Fluoridlösung gewonnenen Huminsäuren ersichtlich ist (Abb. 2). Mit Natriumcarbonat bei p_H 7,5 extrahierte Huminsäuren zeigen das gleiche Pherogramm wie die Natronlaugeauszüge. Bei dem mit Natriumfluoridlösung isolierten Präparat fehlt die Zone der Grauhuminsäuren völlig und der orange fluoreszierende Streifen A ist wesentlich schmaler ausgebildet. Andererseits läßt das mit Natriumdiphosphat gewonnene Präparat die hellblau fluoreszierende Frontzone D vermissen. Bedeutsam erscheint der Befund noch insofern, als lange Zeit die mit Fluoridlösung extrahierten Huminsäuren als besonders rein galten (21,29). Diese Ansicht kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht geteilt werden, vielmehr scheint die Anschauung bestätigt, daß es sich hierbei vorwiegend um "labilere" Huminsäuren handelt (26,16).

C. Versuche zur Gewinnung einheitlicher Fraktionen

Nach dem bisher Dargelegten sind die Huminsäuren nicht einheitlich zusammengesetzt, wobei es letztlich nur eine Frage der Nomenklatur ist, ob man die verschiedenen Typen als eigene Körper oder als Untergruppen des Begriffes Huminsäuren wertet. Die letztere Betrachtungsweise ist insofern vorzuziehen, als die einzelnen Typen nicht rein vorkommen, sich in ihrem chemischen Verhalten überschneiden und gewissermaßen nur als methodische Schwerpunkte

in Erscheinung treten.

Die Fraktionierung der Huminsäuren wurde auf verschiedene Weise versucht:

1) Fraktionierung durch Alkohol

Es wird heute allgemein angenommen, daß die Huminsäuren vorzugsweise aus Lignin entstehen. Die ersten Umwandlungsprodukte, wie sie in Holzmoder oder kompostiertem Stroh auftreten, werden "Humoligninsäuren" oder "Lignohuminsäuren" genannt (21). Sie vereinigen bestimmte Eigenschaften des Lignins mit denen der Huminsäuren und stehen chemisch den "Hymatomelansäuren", dem alkohollöslichen Teil der Huminsäuren nahe, mit denen sie auch häufig identifiziert werden. Letztere gelten meist als unmittelbare Vorstufen der alkoholunlöslichen "Humussäuren" (30), die als eigentliche Huminsäuren angesehen werden. Dagegen hält F u c h s die alkohollöslichen ebenso wie acetonlöslichen Huminsäuren für Abbauprodukte und bezeichnet sie als Dehydrohuminsäuren (5). Nachdem bekannt ist, daß der alkohollösliche Anteil der Huminsäuren durch Behandlung mit Laugen erhöht werden kann (23), hat auch diese Ansicht ihre Berechtigung. Zusammenfassend kann man sagen, daß es sich bei den Hymatomelansäuren offensichtlich um Huminsäurevarietäten niedrigeren Molekulargewichts handelt, deren Herkunft von Fall zu Fall verschieden ist.

Bei sechs untersuchten Huminsäuren lag der alkohollösliche Anteil zwischen 23 und 50 % (Tab. 3). Für das Huminsäurepräparat Acidum huminum Merck wird vergleichsweise ein Gehalt von 25 - 27 % angegeben. Bemerkenswert ist, daß die Humoligninsäuren aus vermodertem Holz (VIII) trotz ihres unzweifelhaften Vorstufencharakters nur verhältnismäßig wenig in Alkohol löslich sind.

Die Pherogramme der Fraktionen zeigen sowohl untereinander als auch gegenüber dem ursprünglichen Präparat deutliche Unterschiede (Abb. 4). Sie zerstören aber auch die Hoffnung, auf diesem Wege ein einheitliches Präparat zu erhalten.

2) Fraktionierung durch Elektrophorese

Im Prinzip erfüllt die Papierelektrophorese als Fraktionierungsmethode alle gestellten Anforderungen, nachdem in einfach-

ster Art bis zu vier Fraktionen erhalten werden können. Allerdings sind die bei der üblichen Horizontalanordnung anfallenden Fraktionsmengen so gering, daß weitere Untersuchungen kaum möglich sind. Diese Schwierigkeiten sollten jedoch überwindbar sein, wenn die dem elektrischen Feld ausgesetzte Substanz nicht einmalig aufgetragen, sondern kontinuierlich zugeführt wird, wie dies bei der Vertikalelektrophorese geschieht.

Trotz intensiver Bemühungen gelang es aber nicht, mit dieser Methode zu einer brauchbaren Trennung zu gelangen, obwohl Spannungen bis zu 1500 V Anwendung fanden. Wie aus Abb. 5 zu ersehen ist, wurden die Huminsäuren zwar in Richtung Anode abgelenkt, trennten sich jedoch nicht in einzelne Komponenten auf. Auf die Deutung dieses Befundes wird an späterer Stelle zurückzukommen sein.

3) Fraktionierung durch Chromatographie

Das schon lange bekannte Verfahren der Säulenchromatographie hat in die Humuschemie bisher kaum Eingang gefunden, obwohl erste Versuche erfolgversprechende Ansätze gezeigt hatten (7,8).

Hieran anknüpfende eigene Versuche mit verschiedenen Aluminiumoxyden (Merck, Woelm), Bleicherden (Tonsil, Frankonit, Floridin), Kieselgur und Calciumcarbonat als Adsorptionsmittel mit dem Huminsäurepräparat aus Moorerde (VII) als Testsubstanz verliefen im Hinblick auf das verfolgte Ziel nicht sehr positiv.

Von Aluminiumoxydsäulen wurde nur ein kleiner Teil der aufgegebenen Huminsäuren sorbiert. Nach dem Auswaschen wiesen die Säulen jeweils am oberen Ende eine durchschnittlich 3 cm breite rötlich-braune Zone auf, die ohne markante Begrenzung in eine gleichmäßig graue Färbung der restlichen Säule überging. Die sorbierten Anteile waren praktisch nicht eluierbar. Verdünntes Ammoniak, Natronlauge, Pyridin und Pyridin-Wasser lösten nur unerhebliche Mengen und bewirkten keine merkliche Aufhellung der Säule.

Bei Bleicherde und Kieselgursäulen waren die Durchlaufgeschwindigkeiten sehr gering und konnten auch durch Untermischen von feinem Sand nicht erheblich verbessert werden. Die Sorption war gering, eine Elution der Zonen ebenfalls nicht möglich.

Auch an Calciumcarbonat fand nur eine geringe Adsorption statt. Nach dem Auswaschen war die Säule bis auf einen kräftigen schwarz-braunen Ring am oberen Ende rein weiß. Auf Grund der Farbe und des Umstandes, daß Grauhuminsäuren im Unterschied zu den Braunhuminsäuren unlösliches Calciumhumat bilden, war zu erwarten, daß der sorbierte Anteil aus Grauhuminsäuren besteht. Die Untersuchung eines

ammoniakalischen Teileluats und der restlichen, nicht desorbierbaren Anteile nach Auflösen der Säulenfüllung in Salzsäure konnte diese Vermutung nicht bestätigen.

Unter Übergang zahlreicher Einzelheiten ist festzustellen: Auf diesem Wege ist keine quantitative Fraktionierung der Huminsäuren möglich, die Methode erscheint jedoch für qualitative Unterscheidungen brauchbar. Die Anordnung ist allerdings für diese Zwecke recht umständlich.

Bessere und rascher erzielbare Ergebnisse werden erhalten, wenn man das Adsorptionsmittel nicht in Säulen einfüllt, sondern in dünner Schicht auf Glasplatten ausstreicht. Diese als Platten- oder Dünnschichtchromatographie bezeichnete Anordnung (13) hat gewisse Ähnlichkeit mit der Papierchromatographie. Die Untersuchungslösungen werden auf eine "Startlinie" am unteren Ende der Platte aufgetropft, eingetrocknet und die Platten dann leicht geneigt mit der Unterkante in das Lösungsmittel eingestellt. Nach einer Viertelstunde ist die Entwicklung beendet.

Die besten Ergebnisse zeigten Platten, die mit Aluminiumoxyd präpariert und mit einem Fließmittelgemisch aus 0,25 m Natriumdiphosphatlösung, 1 n Natriumfluoridlösung und 1 n Ammoniak im Verhältnis 7:3:2 entwickelt waren. Die Chromatogramme verschiedener Huminsäuren ließen mehrere Zonen erkennen - so zwei sichelförmige braune mit einem darüberliegenden grauschwarzen Fleck (Abb. 6).

Nach dem Farbton zu urteilen, könnte es sich bei der oberen Zone um Grauhuminsäuren, bei den beiden unteren um Braunhuminsäuren handeln. Weil die Chromatogramme aller untersuchten Huminsäuren - mit Ausnahme der Humoligninsäuren aus vermodertem Holz (VIII) - einen grauschwarzen Flecken aufweisen, würde dies aber bedeuten, daß alle Präparate mehr oder weniger Grauhuminsäuren enthalten, obgleich elektrophoretisch - abgesehen von dem Huminsäurepräparat aus Moorerde (VII) - Grauhuminsäuren nicht oder doch nur in Spuren nachzuweisen sind.

Der Versuch, die fraglichen Flecke durch Vergleichschromatogramme von Lösungen reiner Grauhuminsäuren zu identifizieren, blieb erfolglos; die Grauhuminsäuren bildeten vom Start weg einen langgezogenen schwarzgrauen Fleck, der keinerlei Beziehungen zu

den Chromatogrammen der anderen Huminsäuren erkennen ließ.

Die Versuche zeigen, daß die Chromatographie Möglichkeiten der Fraktionierung eröffnet, daß aber die erhaltenen Fraktionen ohne erkennbare Beziehungen zu anderweitig darstellbaren Fraktionen sind.

4) Fraktionierung durch partielle Flockung

Huminsäuren können wie andere organische Kolloide aus ihren Lösungen durch starke Elektrolyte ausgeflockt werden. Diese Entdeckung geht auf eine Beobachtung von S p r i n g e r zurück, daß bei bestimmten Bodentypen die Farbtiefe der Huminsäureextrakte mit höherer Laugenkonzentration abnimmt (25). Wie weitere Untersuchungen ergaben, werden mit steigender Laugenkonzentration zuerst Grauhuminsäuren, später auch Braunhuminsäuren ausgeschieden.

Mit Hilfe der unterschiedlichen Flockbarkeit durch Elektrolyte war es S p r i n g e r dann erstmals möglich, Grau- und Braunhuminsäuren zu trennen (26). F l a i g , S c h e f f e r und K l a m r o t h haben neuerdings dieses Fraktionierungsprinzip aufgegriffen, wobei sie 2 n Natronlauge bzw. Natriumchlorid als Flockungsmittel verwendeten (2).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde das Huminsäurepräparat aus Moorerde (VII), das als einziges Grauhuminsäuren in größerer Menge enthielt, außer in Anlehnung an die Arbeitsweise der genannten Autoren mit Natronlauge und Natriumchlorid auch mit Natriumfluorid fraktioniert. Letzteres wurde gewählt, weil bei den Extraktionsversuchen mit 2%iger Natriumfluoridlösung keine Grauhuminsäuren erhalten wurden, diese also offenbar in 2%iger Natriumfluoridlösung nicht löslich sind. Den Arbeitsgang veranschaulicht Abb. 7.

Die Ausbeuten an Grauhuminsäuren (wasser- und aschefrei berechnet) betrugen, bezogen auf organische Substanz der Ausgangshuminsäuren:

Flockungsmittel	Konzentration n	Grauhuminsäuren %	Braunhuminsäuren %	Verlust %
Natronlauge	2	42,9	40,6	16,5
Natriumchlorid	2	45,6	31,0	23,4
Natriumfluorid	~ 0,5	52,7	28,4	18,9

Zur Feststellung der Reinheit bzw. Einheitlichkeit wurden die angefallenen Fraktionen der Elektrophorese unterworfen (Abb. 8).

Die mit Natronlauge ausgeflockte G-Fraktion verhielt sich elektrophoretisch einheitlich und besteht somit aus reinen Grauhuminsäuren. Das Pherogramm der B-Fraktion hingegen ließ neben Braunhuminsäuren noch erhebliche Mengen an Grauhuminsäuren erkennen. Qualitativ unterscheidet es sich kaum von dem der Ausgangshuminsäuren.

Die Fraktionierung mit Natriumchlorid führte zu einer B-Fraktion, die nur in geringem Umfang durch Grauhuminsäuren verunreinigt ist, die G-Fraktion schließt jedoch erhebliche Mengen an Braunhuminsäuren ein.

Am exaktesten gelang die Trennung mit Natriumfluorid. Sowohl die G-Fraktion als auch die B-Fraktion erscheint elektrophoretisch als einheitlich.

F l a i g und Mitarb. ziehen aus ihrer Arbeit den Schluß, daß für die Flockung der Grauhuminsäuren nur die Anwesenheit des Natriumions in 2 normaler Konzentration maßgeblich sei. Demgegenüber konnte in den oben angeführten eigenen Versuchen bereits mit einer 2%igen, also annähernd 0,5 n Natriumfluoridlösung eine völlige Abscheidung der Grauhuminsäuren erreicht werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von S p r i n g e r (26), der bei einer Natronlaugekonzentration von 2 % - entsprechend einer Na^+ -Konzentration von 0,5 n - ebenfalls eine Trennung von Grau- und Braunhuminsäuren erzielte.

Das Überraschendste Ergebnis der Versuche ist aber die folgende Beobachtung: R e i n e G r a u h u m i n s ä u r e n w a n d e r n bei der Elektrophorese nicht,

sie verhalten sich elektrisch neutral! Diese Feststellung erscheint außerordentlich wichtig und geeignet, unsere Kenntnisse über das Wesen der Huminsäuren zu vertiefen.

Es sei nochmals festgestellt: Wird ein natürliches Gemisch von Grau- und Braunhuminsäuren der Elektrophorese unterworfen, so wandern beide Typen in Richtung Anode, die Braunhuminsäuren schneller, die Grauhuminsäuren langsamer. Sobald aber beide Typen voneinander getrennt sind, wandern die Grauhuminsäuren nicht mehr, während die Braunhuminsäuren keine Änderung ihrer Wandergeschwindigkeit erkennen lassen. Es ist also naheliegend anzunehmen, daß die Braunhuminsäuren auf die Grauhuminsäuren lösend wirken.

Besonders eindrucksvoll wird das durch folgenden Versuch bestätigt: Unterbricht man die Elektrophorese reiner Grauhuminsäuren nach einiger Zeit, trägt reine Braunhuminsäuren am gleichen Ort auf und fährt dann mit der Elektrophorese fort, so lösen sich auf den Zusatz hin die Grauhuminsäuren von der Startlinie und bewegen sich in Richtung Anode. Dieser Effekt ist nicht nur auf Braunhuminsäuren des gleichen Ausgangsmaterials beschränkt. Die gleiche Wirkung konnte auch mit einer dioxanlöslichen Fraktion des Huminsäurepräparates Riedel de Haën (X) und mit einer, zwangsläufig nur schwach konzentrierten Lösung eines Ligninpräparates erzielt werden. Wenn sich hierbei auch nicht die gesamten Grauhuminsäuren von der Startlinie lösten (Abb. 8 IV), so hat dies zweifellos weniger am Prinzip als an der zu geringen Konzentration der Zusätze gelegen.

Immer wieder ist auch zu beobachten, daß während der Elektrophorese eines natürlichen Gemenges von Grau- und Braunhuminsäuren zunächst eine einheitliche Front wandert; erst nach etwa einer Stunde Laufzeit lösen sich die beiden Fraktionen voneinander. Aus ungeklärter Ursache flocken die Grauhuminsäuren plötzlich aus und bleiben unbeweglich liegen, während die Braunhuminsäuren allein weiterlaufen. An Stellen vermehrter Substanz, wie sie beim Auftragen nicht immer zu vermeiden sind, löst sich die braune Front von der grauschwarzen Zone erst später. Dementsprechend ist die Zone der Grauhuminsäuren an diesen Stellen weiter

vorgeschoben, die Braunhuminsäurezone hängt dafür geringfügig nach. Der gewellte bzw. gezackte Verlauf der Grauhuminsäurezone findet hierin seine Erklärung.

Damit wird auch verständlich, warum eine präparative Trennung durch Papierelektrophorese mit dem Elphor-V-Gerät nicht möglich war: Der dauernde Nachlauf an frischer Substanz verhindert eine definitive Trennung von Grau- und Braunhuminsäuren. Zwar kann nach längerer Laufzeit eine teilweise Abscheidung der Grauhuminsäuren infolge anwachsenden Überschusses nahe der Zuführstelle eintreten, doch läßt sich dadurch weder die eine noch die andere Fraktion rein gewinnen.

Abschließend kann jedenfalls als wichtigstes Kennzeichen reiner Grauhuminsäuren festgestellt werden, daß sie sich unter den angewandten Bedingungen elektrisch neutral verhalten.

D. Eigenschaften der Huminsäuren und Huminsäurefraktionen

Die den nachfolgenden Untersuchungen zugrunde liegenden Huminsäuren wurden durch annähernd neutrale Extraktion mit Natriumcarbonat bei p_H 7,5 gewonnen; sie bildeten auch das Ausgangsmaterial der hier untersuchten Fraktionen. Lediglich die Humoligninsäuren aus dem vermoderten Holz (VIII) wurden mit Natronlauge extrahiert, weil hier die Ausbeute bei annähernd neutraler Extraktion zu gering war.

Bei der Bestimmung des Wassergehalts durch Karl-Fischer-Titration und durch Trocknung bei 105° traten verschiedentlich Differenzen zutage, ohne daß eine einheitliche Tendenz zu erkennen gewesen wäre. Der Umrechnung wurden deshalb grundsätzlich die durch Trocknung bestimmten Werte zugrunde gelegt.

1) Zusammensetzung

Die Ergebnisse der Elementaranalyse sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Zunächst ist festzustellen: Die elementare Zusammensetzung der Huminsäuren weicht von der Zusammensetzung der Gesamtmasse des organischen Ausgangsmaterials kaum ab. In früheren Veröffentlichungen wird für 44 Flachmoortorfe ein durchschnittlicher Kohlenstoffgehalt von 56 %, bezogen auf die aschefreie Trockenmasse, desgleichen für 7 Hochmoortorfe ein Durchschnitt von 57 % C angegeben (11). Erdige, bitumenarme Braunkohlen enthalten 60 - 65 % C und 5 - 6 % H (6). Der Kohlenstoffgehalt in Tabelle 4 kommt diesen Werten recht nahe; ähnliches gilt für die Werte der anderen Elemente. Bedeutsam im Hinblick auf die Abstammung erscheint, daß Huminsäuren im Mittel etwa 14 % mehr Kohlenstoff als Zellulose, jedoch etwa 6 % weniger als die Lignine enthalten.

Erhebliches praktisches Interesse findet die Frage, ob die Herkunft der Huminsäuren anhand der Elementaranalyse festgestellt werden kann. Wenn diese Möglichkeit auch für den Einzelfall verneint werden muß, so ergeben sich in der statistischen Gesamtheit doch gewisse prinzipielle Unterschiede. Wie die bisher veröffentlichten Werte zeigen, liegt der Kohlenstoffgehalt der Huminsäuren aus Braunkohle im Durchschnitt etwas höher als der von Torfhuminsäuren - eine Feststellung, die auch in den vorliegenden Ergebnissen zum Ausdruck kommt. Feinere Unterscheidungen - etwa nach Torfart oder Entnahmetiefe - erscheinen vorderhand nicht möglich, jedenfalls liegen in dieser Richtung nur unbestätigte Einzelbeobachtungen vor.

Der Stickstoffanteil läßt sich durch Salzsäurehydrolyse in mehrere Fraktionen aufgliedern. Nach neuesten Untersuchungen entfallen dabei ca. 69 - 75 % des Torf- und ca. 79 - 88 % des Braunkohlehuminsäure-Stickstoffs auf Rückstand- (Kern-) und Protein-Stickstoff (ca. 4 - 33 % des Gesamtstickstoffs einiger auch hier untersuchter Huminsäuren) (15). Es läßt sich allerdings derzeit nicht entscheiden, ob das vorhandene Protein beispielsweise in Form von Peptidseitenketten am Huminsäuremolekül oder als Verunreinigung vorliegt.

Bei der Fraktionierung des Huminsäurepräparates Riedel de Haën (X) mit Alkohol zeigt der Vergleich des unlöslichen und löslichen Anteils, daß die unlöslichen Humussäuren kohlenstoffreicher, hingegen wasserstoffärmer und stickstoffärmer als die löslichen Hyatomelansäuren sind. Dieses Ergebnis deckt sich allerdings nicht mit den Untersuchungen anderer Autoren, die für Kohlenstoff und Stickstoff umgekehrte Verhältnisse fanden (10,14).

Wie aus Tabelle 4 ferner hervorgeht, unterscheiden sich die Grauhuminsäuren von den Braunhuminsäuren durch einen höheren Gehalt an Kohlenstoff und einen niedrigeren Gehalt an Wasserstoff. Gilt diese Feststellung zunächst auch nur für die aus Moorerde (VII) stammenden Huminsäuren, so kamen F l a i g und Mitarb. bei der Fraktionierung von Huminsäuren einer Schwarzerde und eines Podsols zum gleichen Ergebnis (2). Die früher vertretene Ansicht, daß Grauhuminsäuren stickstoffreicher als die Braunhuminsäuren seien, konnte jedoch durch die vorliegenden Ergebnisse in Übereinstimmung mit den genannten Autoren nicht bestätigt werden. Die Art der Fraktionierungsmittel scheint nach vorläufigen Feststellungen das Ergebnis nicht zu beeinflussen.

2) Strahlenabsorption im UV und sichtbaren Bereich

Aus den Absorptionsspektren von Huminsäurelösungen lassen sich ziemlich präzise Aussagen über die Zusammensetzung der Präparate aus "jungen" bzw. labilen und "reifen" bzw. stabilen Huminsäureformen gewinnen. Nach Untersuchungen von S p r i n g e r (26) und von S c h e f f e r und W e l t e (17) verlaufen die Absorptionskurven der labileren Formen steiler als diejenigen der stabileren Verbindungen. Als Unterscheidungsmerkmal dient der sogenannte Farbquotient. Man versteht darunter den Quotienten der Extinktionskoeffizienten zweier verschiedener Wellenlängen, z. B.:

$$\text{Farbquotient } FQ_{472/664} = \frac{\text{Extinktionskoeffizient } 472 \text{ m}\mu}{\text{Extinktionskoeffizient } 664 \text{ m}\mu}$$

Nach Angaben von W e l t e beträgt der Farbquotient $FQ_{472/664}$ für Grauhuminsäuren 2,2 - 2,8, für Braunhuminsäuren 5,0 - 5,5. Noch höhere Werte sollen auf Verbindungen von starkem Vorstufen-

charakter hindeuten (31).

Die Ausmessung der Absorptionsspektren erfolgte an 0,001%igen Lösungen mit dem Zeiss-Opton-Spektralphotometer. In den Abb. 9 - 18 ist ein Teil der Meßergebnisse nach verschiedenen Gesichtspunkten zusammengestellt. Hiernach nehmen die Huminsäuren aus vermodertem Holz (VIII) insofern eine Sonderstellung ein, als ihr Spektrum weitgehend dem des Lignins ähnelt, dessen charakteristisches Maximum je nach der zugrunde liegenden Holzart zwischen 274 und 283 m μ liegt. Auf Grund der Herkunft und des Spektrums sind sie deshalb den sogenannten Humoligninsäuren zuzuordnen (Abb. 9).

Die Huminsäuren anderer Herkunft weisen im Kurvenverlauf ihrer Spektren keine charakteristischen Merkmale auf, auch unterscheiden sie sich nur geringfügig voneinander. Das Gefälle der Kurve ist am geringsten bei den Huminsäuren aus Moorerde (VII) und nimmt in Richtung der Huminsäuren aus Braunkohle (IX), Zwischenmoortorf (IV), Hochmoortorf (II) und den Humoligninsäuren aus vermodertem Holz (VIII) zu (Abb. 9 - 11).

Die Absorptionskurve der Hymatomelansäuren verläuft gegenüber dem Spektrum der Ausgangshuminsäuren steiler, diejenige der Humus-säuren entsprechend flacher (Abb. 17). Demnach handelt es sich bei den alkohollöslichen Anteilen um niedermolekulare, chemisch labilere Verbindungen.

Ein Vergleich der Grau- und Braunhuminsäurefraktionen aus Moorerde (VII) zeigt erwartungsgemäß, daß die Spektren der Grauhuminsäuren flacher verlaufen (Abb. 18).

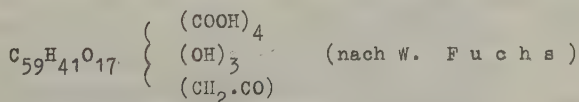
Der Einfluß der Extraktionsmittel gibt sich im Verlauf der Kurven ebenfalls zu erkennen (Abb. 12 - 16). Dabei konnte aber die Auffassung von dem labileren Charakter der Natriumfluoridextrakte (26,16) nicht allgemein bestätigt werden, denn bei Hochmoortorf (II) und Zwischenmoortorf (IV) weisen die mit Natriumfluorid gewonnenen Huminsäuren eine etwas schwächere Kurvenneigung auf als die alkalischen Auszüge. Da es sich bei beiden Ausgangsmaterialien um verhältnismäßig wenig zersetzte Torfe handelte, ist allerdings anzunehmen, daß aus praktisch als Verunreinigung vorliegenden, nur unvollständig zersetzten Pflanzenteilen

durch die alkalische Extraktion ein gewisser Anteil an labilen Verbindungen - ähnlich den auch nur alkalisch extrahierbaren Humoligninsäuren aus Holzmoder (VIII) - in Lösung ging. Diese Erscheinung ist auch bei den mit Natronlauge extrahierten Huminsäuren aus den Rückständen von der Diphosphat- und der Fluoridextraktion des Flachmoortorfs (V) zu beobachten.

Vergleicht man die Neigungen der Kurven anhand des oben beschriebenen Farbquotienten, so zeigt sich, daß die Zahlenwerte stark von dem unregelmäßigen Verlauf der Kurvenzüge ab 550 mμ beeinflusst werden und nicht unbedingt ein zutreffendes Bild vermitteln. Da die Kurven im Bereich von 300 - 500 mμ annähernd geradlinig verlaufen, kann der Farbquotient $FQ_{300/500}$ als instruktiver angesehen werden als der vom Filterphotometer abgeleitete Quotient $FQ_{472/664}$, obwohl dieser zugegebenermaßen dem Farbton der Lösungen besser gerecht wird (Tab. 5). Der Farbquotient $FQ_{300/500}$ beträgt für reine Grauhuminsäuren (aus Moorerde) 3,8, für reine Braunhuminsäuren (aus Moorerde) 6,2; höhere Werte deuten auf Hymatomelansäuren, Humoligninsäuren u. dgl. hin.

3) Strahlenabsorption im Infrarot

Die herkömmlichen Methoden der Konstitutionsermittlung haben für die Huminsäuren zu etwa folgender Formel geführt:



Davon ausgehend und unter Berücksichtigung der Ergebnisse des oxydativen Abbaus hat F u c h s ein Schema der mutmaßlichen Huminsäurekonfiguration skizziert, das zwar eine ungefähre Vorstellung vom Aufbau des Moleküls vermittelt, in der Gesamtkonzeption wie in Feinheiten der Struktur jedoch recht willkürlich ist (6).

In jüngster Zeit wird nun zur Klärung von Konstitutionsfragen in immer größerem Umfang die Infrarot-Spektroskopie herangezogen. Das Verfahren liefert rasche und genaue Ergebnisse und gestattet insbesondere auch routinemäßige Vergleichsuntersuchungen.

An den für das menschliche Auge als "Licht" wahrnehmbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums schließt sich zu den längeren Wellen hin die infrarote Strahlung an. In diesem Gebiet treten die Rotations- und Schwingungsspektren der Moleküle als Absorptionsbanden in Erscheinung. Wichtig für die Konstitutionsermittlung ist nun, daß die das Spektrum bestimmenden Rotations- und Schwingungsfrequenzen in einfacher Weise von den Bindungskräften zwischen den Atomen und den Trägheitsmomenten um bestimmte Achsen abhängen. Man unterscheidet im allgemeinen den Bereich der reinen Rotationsspektren von 25 - 50 μ und darüber, den Bereich der Grundschrwingungen von 2,5 - 25 μ und den Bereich der Oberschwingungsspektren unter 2,5 μ .

Da die Bindekräfte zwischen den Atomen durch die elektronische Struktur der Bindungen bestimmt sind, ist es verständlich, daß die Schwingungsfrequenzen bestimmter Atomgruppen ziemlich konstant sind und nur wenig von dem an der charakteristischen Gruppe hängenden Molekülrest beeinflußt werden. Diese Lagekonstanz der Banden ist am ausgeprägtesten bei den Valenzschwingungen (2,6 - 7 μ), d. h. Schwingungen längs der Achse größter Elektronendichte zwischen zwei Atomen. Die Deformationsschwingungsbanden (7 - 15 μ) rühren von Schwingungen quer zur Bindungsachse der beteiligten Atome her und werden durch den Molekülrest stärker in ihrer Lage im Spektrum beeinflußt als die Valenzschwingungsbanden.

Die Lage der Banden wird demnach bestimmt durch die chemische Konstitution; die Bandenhöhe (in den Abb. die Tiefen der Minima) hingegen entspricht der Minderung der Strahlendurchlässigkeit in Prozent und erlaubt somit quantitative Rückschlüsse.

Die Infrarotspektren der Huminsäuren und ihrer Fraktionen sowie zum Vergleich des Lignins, sind in den Abb. 19 - 21 wiedergegeben. Die im Bereich von 2,9 - 10 μ auftretenden Banden lassen sich wie folgt deuten:

- 2,9 μ Die Bande liegt im Bereich der OH-Valenzschwingungen (2,6 - 3 μ). Die Lage bei 2,9 μ und die Breite der Bande deuten auf wasserstoffbrückengebundene Hydroxylgruppen. (Es können sowohl zwei Hydroxylgruppen als auch eine OH- und eine C=O-Gruppe assoziiert sein; im letzten Fall ist die C=O-Valenzschwingungsbande im Bereich von 5,5 - 6,5 μ in zwei flachere Banden aufgespalten.)
- 3,1 μ Die Bande kann sowohl wasserstoffgebundene Hydroxylgruppen als auch Amid anzeigen. Das Auftreten der Bande scheint von dem Alter der Huminsäuren abhängig zu sein; sie fehlt bei den Humoligninsäuren und den Huminsäuren aus jüngerem Hochmoortorf (II), ebenso beim Lignin. Wahrscheinlicher ist deshalb die Stickstofffunktion.

- 3,4 μ Im Gebiet von 3,35 - 3,5 μ befinden sich die aliphatischen Valenzschwingungen; sie zeigen CH_3 - und CH_2 -Gruppen an. Die Bande erscheint mehr oder weniger ausgeprägt.
- 5,8 μ Von 5,5 - 6,5 μ erstreckt sich der Bereich der C=O-Valenzschwingungen. Die durchweg schwach ausgeprägte Bande bei 5,8 μ ist charakteristisch für C=O-Gruppen von Ketonen, Säuren und Estern.
- 6,1 μ Die Bande weist auf Arylaldehyde, α -, β -ungesättigte Ketone bzw. Säuren, Chinone und heterocyklische Aromaten hin. In annähernd den gleichen Bereich fallen allerdings auch NH-Deformationsschwingungen von primären und sekundären Aminen und primären Amiden.
- 6,6 μ Banden zwischen 6,25 und 6,6 μ deuten auf C=C-Ringschwingungen und substituierte Benzolkkerne hin.
- 6,8 μ Die Bande wird hervorgerufen durch CH-Deformationsschwingungen von CH_3 - und CH_2 -Gruppen.
- 7,0 μ Die Bande zeigt die Anwesenheit aliphatischer Gruppen im Ligninkomplex an.
- 7,1 μ Auch diese Bande wird durch CH-Deformationsschwingungen aliphatischer Glieder hervorgerufen. Die Lage der Extinktionsmaxima der CH-Deformationsfrequenzen ist in diesem Bereich schon weitgehend abhängig von der Art der Molekülreste am schwingenden System. In verstärktem Maße gilt dies für die nachfolgenden langwelligeren Banden.
- 7,8 - 10 μ Die Banden in diesem Bereich werden durch "Gerüstschwingungen" des ganzen Moleküls hervorgerufen. Die Deutung ist deshalb sehr unsicher. In den Bereich fallen auch Banden von (phenolischen) OH-Gruppen, substituierten Benzolkernen, Ätherbindungen, Säuren, Estern und aliphatischen Ketonen. Lage und Intensität der Banden sind stark abhängig von der Art, in der diese Gruppen an den Rest des Moleküls gebunden sind. Banden in diesem Bereich treten nur in den

Spektren des Lignins und der Humoligninsäuren auf.

Charakteristische Unterschiede im Hinblick auf die Herkunft der Huminsäuren sind an den Spektren nicht festzustellen. Die weitgehende Ähnlichkeit der Spektren untereinander wie auch mit dem Spektrum des Lignins läßt eine weitgehende Ähnlichkeit der Konstitution erwarten. Bemerkenswert ist in dieser Hinsicht die Übergangstellung der Humoligninsäuren.

So ist beispielsweise die C=O-Bande beim Lignin kaum ausgebildet, bei den Humoligninsäuren bereits ausgeprägter und am stärksten bei den Huminsäuren. Zurückzuführen ist diese Intensitätszunahme wahrscheinlich auf die Ausbildung von Säuregruppen.

Die für substituierte Benzolkerne und C=C-Ringschwingungen charakteristische Bande, im Ligninspektrum bei 6,25 μ , ist in den Spektren der Huminsäuren nach kürzeren Wellenlängen hin (6,1 - 6,2 μ) verschoben. Die gleichzeitige Verbreiterung der Bande wird als Stickstoffeinbau in das Molekül gedeutet (20).

Das starke Extinktionsmaximum des Ligninspektrums bei 6,6 μ , ebenfalls auf C=C-Ringschwingungen beruhend, ist bei den Humoligninsäuren noch abgeschwächt vorhanden, bei den anderen Huminsäuren ganz verschwunden. Das gleiche gilt für die durch CH-Deformationschwingungen hervorgerufenen Banden bei 6,8 und 7,0 μ . Hingegen fehlt dem Lignin, den Humoligninsäuren (und auch den Huminsäuren aus Hochmoortorf (II)) die ausgeprägte Bande bei 7,1 μ .

Die Banden im Bereich von 7,8 - 10 μ des Ligninspektrums sind bei den Humoligninsäuren noch abgeschwächt vorhanden, bei den Huminsäuren fehlen sie. Aus der "Einebnung" ist zu folgern, daß das Lignin, eine relativ definierte Verbindung, im Verlauf der Humifizierung zunehmend in ein heterogenes Stoffgemisch umgewandelt wird. Man kann sich vorstellen, daß die Anzahl der Banden in diesem Bereich dabei derartig zunimmt, daß durch die Überlagerungen keine Spitzen mehr in Erscheinung treten können.

Die Abb. 20 bringt einen Vergleich der Huminsäuretypen bzw. -fraktionen.

Grau- und Braunhuminsäuren unterscheiden sich in ihren IR-Spektren weder vom Ausgangspräparat noch untereinander.

Deutliche Unterschiede treten hingegen bei den Alkoholfraktionen zutage. Die NH-Valenzschwingungen des Ausgangspräparates kehren ausschließlich (und verstärkt) bei den Hymatomelansäuren wieder. Ergänzend sei daran erinnert, daß auch die Elementaranalyse eine Anreicherung des Stickstoffs in der alkohollöslichen Fraktion nachwies. Auch die C=O-Bande ist bei den Hymatomelansäuren wesentlich intensiver, die Säurenatur also wesentlich stärker ausgeprägt. Bemerkenswert ist auch die Intensitätsaufteilung der Bande bei 7,1 μ , deren Bedeutung allerdings noch nicht feststeht.

Abschließend bleibt festzustellen: Wenn die Infrarot-Spektroskopie auch keine grundlegend neuen Kenntnisse über den Feinbau der Huminsäuren vermittelt, so festigt sie doch die bestehenden Anschauungen und erlaubt überdies einen raschen und präzisen Nachweis struktureller Unterschiede zwischen den Vertretern dieser Stoffgruppe und stellt in diesem Sinne eine wertvolle Bereicherung der Methodik dar.

4) Flockbarkeit

Werden Huminsäuren aus ihren Lösungen durch Zugabe verdünnter Säuren ausgefällt, so zeigt eine laufende Kontrolle des p_H -Wertes der Lösung, daß die Koagulation der Huminsäuren bei verschiedenen p_H -Werten einsetzt und bei verschiedenen Werten beendet ist. Inwieweit der Flockungsverlauf als charakteristisches Merkmal der einzelnen Huminsäuren angesehen werden kann, sollte folgender Versuch klären:

Zur Festlegung des Flockungsverlaufes wurden die Lösungen der Huminsäuren auf verschiedene p_H -Werte eingestellt und der jeweils gefällte Anteil gravimetrisch bestimmt. Hierbei ergaben sich die in den Abb. 22 u. 23 dargestellten Verhältnisse.

Am frühesten, d. h. bei den höchsten p_H -Werten, setzt demnach die Flockung der Humoligninsäuren und der Huminsäuren aus Moorerde (VII) ein. Wenig später flockt auch die Hauptmenge der Huminsäuren aus Braunkohle (IX) aus und zuletzt fallen wenig differen-

ziert die Huminsäuren des Hochmoortorfes (II), des Zwischenmoortorfes (IV) und des Präparates Riedel de Haën (X). Am größten sind die quantitativen Unterschiede der gefällten Anteile im Bereich von p_H 3,5 - 3. Ein Hinweis auf die Herkunft oder das Alter der verschiedenen Huminsäuren in dem Sinne, daß die Flockbarkeit mit dem p_H -Wert zunehmen würde, ist den Fällungskurven nicht zu entnehmen.

Deutliche Flockungsunterschiede bestehen zwischen den Grau- und Braunhuminsäuren. Die Fällung der Grauhuminsäuren beginnt bereits bei p_H 4 und ist bei p_H 3,5 beendet. Die Braunhuminsäuren dagegen fangen erst bei etwa p_H 2 an auszufallen, so daß der Endpunkt im Untersuchungsbereich nicht erreicht wurde. Auf diese Weise müßte also prinzipiell eine einwandfreie Trennung der Grau- und Braunhuminsäuren zu erreichen sein. Wie die Fällungskurve des Ausgangspräparates jedoch zeigt, ist dies nicht der Fall. Wenn die Ausfällung der Grauhuminsäuren bei p_H 4 beginnt und bei p_H 3,5 beendet ist, so müßte die Kurve von diesem Punkt ab bis etwa p_H 2,5 parallel zur Abszisse verlaufen, da in diesem Bereich keine Huminsäuren ausgefällt würden; erst von p_H 2 an würde die Kurve dann steil nach oben verlaufen, um irgendwo im stark sauren Gebiet die Grenze von 100 % zu erreichen. Tatsächlich läßt sich jedoch der Fällungsverlauf nicht aus den Einzelkomponenten rekonstruieren. Wahrscheinlich spielt auch hier die schon bei der Elektrophorese aufgetretene gegenseitige Löslichkeitsbeeinflussung der beiden Huminsäuretypen eine entscheidende Rolle.

Die Humussäuren stimmen in ihrem Fällungsverhalten weitgehend mit den Grauhuminsäuren überein.

E. Methodischer Teil

Präparative Isolierung der Huminsäuren

Eine 100 g Trockensubstanz entsprechende Menge lufttrockenen Materials von weniger als 0,2 mm Korngröße wurde mit 1 Liter 5%iger Salzsäure innig verrührt und über Nacht stehen gelassen. Nach dem Abzentrifugieren und 2maligen Auswaschen mit dest. Wasser wurde der Rückstand mit 1 Liter Extraktionsflüssigkeit (0,5%ige Natronlauge, 0,1 m Natriumdiphosphatlösung, 2%ige Natriumfluoridlösung) versetzt und während der 24stündigen Einwirkungszeit gelegentlich durchgerührt. Alsdann wurde der Auszug durch Zentrifugieren abgetrennt und sofort nach Filtration über ein Papierfilter - zur Beseitigung aufschwimmender Holzteilchen, Holzpartikelchen u. dgl. - mit verdünnter Salzsäure angesäuert, worauf die Huminsäuren ausfielen. Der Extraktionsrückstand wurde in gleicher Weise nochmals einen Tag, beim dritten Mal 3 Tage lang mit dem Extraktionsmittel behandelt. Die Extrakte wurden jeweils über das gleiche Papierfilter gegeben und im vorhergehenden angesäuerten Filtrat aufgefangen. Durch neuerliche Säurezugabe wurden die Huminsäuren wieder vollständig gefällt. Der Huminsäurenniederschlag blieb noch einen Tag stehen, wurde dann abzentrifugiert und 3mal mit Wasser ausgewaschen. Zur Umfällung wurde der Niederschlag in 1 Liter 1%igem Ammoniak gelöst, nach Filtration erneut mit Salzsäure gefällt und abzentrifugiert. Nach mehrmaliger Wiederholung wurde der Niederschlag an der Zentrifuge bis zur beginnenden Peptisation mit 0,01 n Salzsäure ausgewaschen.

In prinzipiell gleicher Weise erfolgte die Gewinnung mit Natriumcarbonat, nur trat an Stelle des Extraktionsmittels dest. Wasser. Die wässerige Aufschwemmung wurde anschließend jeweils mit konz. Sodalösung auf $p_H 7,5 \pm 0,1$ eingestellt.

Die so gewonnenen Huminsäuregele wurden auf Glasplatten ausgestrichen, an der Luft oder im Trockenschrank bei 50° getrocknet, im Mörser fein verrieben und in dicht schließenden Glasflaschen

aufbewahrt. Wasser- und Mineralstoffgehalt wurden in üblicher Weise durch Trocknen und Veraschen bestimmt.

Das Huminsäurepräparat der Firma Riedel de Haën wurde mittels Ammoniak und Salzsäure umgefällt; der ursprüngliche Aschegehalt von 10,31 % erniedrigte sich dadurch auf 4,35 %.

Bestimmung der Ausbeuten

Eine etwa 1 g Trockenmasse entsprechende Torfmenge wurde in einem Zentrifugenglas mit 50 ml 1 n Salzsäure gut verrührt und über Nacht stehen gelassen. Am anderen Morgen wurde der abgesetzte Torf abzentrifugiert (3 000 U/min; 15 min), 4mal mit je 50 ml Wasser ausgewaschen, anschließend mit 40 ml Extraktionsmittel versetzt, eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur maschinell gerührt und der anfallende Extrakt sofort abzentrifugiert. Der Rückstand wurde unmittelbar anschließend in gleicher Weise noch 4mal mit je 40 ml Extraktionsmittel ausgezogen. Der nach der 5. Extraktion verbliebene Rückstand wurde noch 2mal mit je 40 ml Wasser ausgewaschen, dann verworfen.

Die vereinigten Extrakte samt Waschwässer wurden in einen 500 ml Messkolben überführt und mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Zur Fällung der Huminsäuren wurde ein aliquoter Teil (250 ml) des aufgefüllten Extraktes mit verdünnter Salzsäure auf p_H 2 eingestellt. Nach mehrstündigem Absetzen wurde der flockige Niederschlag abzentrifugiert, zur Reinigung mehrmals in 40 ml 0,01 n Salzsäure dispergiert und zentrifugiert, bis das Filtrat annähernd farblos war. Zur Umfällung wurde der Rückstand in verdünntem Ammoniak gelöst und wie beschrieben gefällt und gewaschen.

Der Rückstand wurde bei 105° konstant getrocknet und anschließend bei 550° verascht. Die angegebenen Werte beziehen sich auf aschfreie Trockenmasse.

Bestimmung des hydrolysierbaren Anteils

Etwa 1 g des feingepulverten Präparates wurde mit 100 ml 2%iger Salzsäure unter Rückfluß 3 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde durch einen Glasfildertiegel G 2 filtriert, der Rückstand mit angesäuertem Wasser nachgewaschen, bei 105° konstant

getrocknet und in einem aliquoten Teil der Aschegehalt bestimmt.

Bestimmung der Löslichkeit in Acetylbromid

0,15 - 0,25 g feingepulverte Huminsäuren wurden in einem Acetylierungskölbchen mit einem Tropfen Wasser und 20 ml Acetylbromid versetzt und nach Aufsetzen eines eingeschliffenen Steigrohres 4 Tage in einem Thermostaten bei 45° gehalten. Hierauf wurde durch einen Porzellanfiltertiegel A 2 filtriert oder zentrifugiert und der Niederschlag aufeinanderfolgend mit Acetylbromid, Eisessig, Äther und heißem Wasser ausgewaschen. Anschließend wurde nochmals mit Äther nachgespült, bei 105° konstant getrocknet und in einem aliquoten Teil der Aschegehalt bestimmt.

Bestimmung des alkohollöslichen Anteils

In einen Glasfiltertiegel G 2 wurden 1 g des zu untersuchenden Präparates eingewogen und mit Glaswolle abgedeckt. Der Tiegel wurde dann derart in einen Soxhlet-Extraktor eingebracht, daß sich der Fritteboden oberhalb des höchstmöglichen Flüssigkeitsspiegels befand und damit ein ungehindertes Abtropfen des Extraktes gewährleistet war. Die Extraktion mit Äthanol wurde so lange durchgeführt, bis der Alkohol praktisch farblos ablief, was im allgemeinen nach 2 - 3 Tagen der Fall war. Anschließend wurden Trockenmasse und Asche in üblicher Weise bestimmt.

Gewinnung von Hymatomelansäuren und Humussäuren

Etwa 20 g des Huminsäurepräparats wurden in eine Glasfaserhülle gegeben, mit Glaswolle abgedeckt und ebenfalls so in den Extraktor gebracht, daß die Flüssigkeit frei abtropfen konnte. Die Extraktion mit Äthanol wurde solange fortgeführt, bis der Alkohol praktisch farblos ablief, was im allgemeinen etwa 3 Wochen beanspruchte. Die alkoholische Lösung wurde bei 20° im Vakuum eingengt, der Rückstand anschließend bei 50° im Trockenschrank getrocknet.

Gewinnung von Grau- und Braunhuminsäuren

20 ml einer 5%igen neutralisierten Huminsäurelösung wurden mit der gleichen Menge 4%iger Natriumfluoridlösung versetzt, so daß die

Gesamtlösung eine Konzentration von 2 % NaF aufwies. Nach 2stündigem Rühren blieb die Lösung über Nacht stehen. Am nächsten Morgen wurde der ausgefallene Niederschlag, der zur Hauptsache aus Grauhuminsäuren bestand, abzentrifugiert, dann in dest. Wasser gelöst bzw. dispergiert und durch Zugabe des gleichen Volumens 4%iger Natriumfluoridlösung erneut gefällt. Das Auflösen des Niederschlags in dest. Wasser und die Fällung mit einem gleichen Volumen 4%iger NaF-Lösung wurde so lange wiederholt, bis die über dem Niederschlag stehende Lösung farblos war. Vorliegend waren hierzu 7 Fällungen notwendig.

Die angefallenen gefärbten Filtrate (Braunhuminsäurefraktion) wurden vereinigt, mit Salzsäure versetzt, der Niederschlag am anderen Tag abzentrifugiert und durch Lösen in Ammoniak und Fällen mit Salzsäure mehrmals umgefällt. Die ammoniakalische Lösung wurde jeweils zur Entfernung von ausgefallenem Fluorid zentrifugiert.

Der durch Natriumfluorid fällbare Anteil (Grauhuminsäurenfraktion) wurde in dest. Wasser gelöst, mit Salzsäure bei p_H 2 abgeschieden und mittels Ammoniak und Salzsäure mehrmals umgefällt. Beide Fraktionen wurden bei 50° getrocknet. Ein aliquoter Teil diente zur Bestimmung des Wasser- und Aschegehalts.

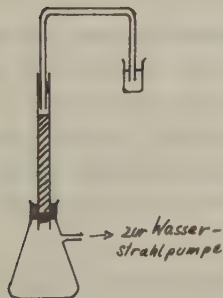
Elektrophorese der Huminsäuren

Die Papierelektrophorese in horizontaler Anordnung wurde im bekannten Elphor-H-Gerät der Firma Bender & Hobein, München, durchgeführt. Als Trägerstreifen diente das Papier Schleicher & Schüll Nr. 2043a. Die günstigsten Versuchsbedingungen hinsichtlich der Huminsäurenkonzentration, Art und p_H -Wert des Puffers wurden in Vorversuchen ermittelt. Die besten Ergebnisse bezüglich der Huminsäurenkonzentration lieferten 5%ige Lösungen in 0,5%igem Ammoniak; geringere Konzentrationen ergaben zu wenig ausgeprägte Zonen. Als Pufferlösungen fanden prim.-sek. Phosphat, Borat-Salzsäure und Veronal-Salzsäure Verwendung. Die besten Resultate ergab Veronal-Salzsäure-Puffer vom p_H 8,7. Bei einer Spannung von 110 V und einer Stromstärke von 20 mA betrug die Laufzeit in der Regel 2 Stunden.

Für die Versuche zur präparativen Fraktionierung der Huminsäuren mittels Papierelektrophorese fand das Elphor-VA-Gerät nach Graßmann-Hannig ¹⁾ Verwendung ²⁾. Als Träger diente Papier Schleicher & Schüll Nr. 2040a, als Puffer kam bis zu einer Spannung von 1000 V Veronal-Salzsäure von p_H 8,7 und bis zu einer Spannung von 1500 V Pyridin-Eisessig-Wasser von p_H 4,9 zur Anwendung. Die Wanderung der Huminsäuren vom Auftragsort bis zu den Auffanggefäßen nahm 4 Stunden in Anspruch.

Chromatographie der Huminsäuren

Säulenchromatographie: Die verwendeten Säulen bestanden aus Glasröhren von 20 cm Länge und 0,6 cm lichter Weite. Der untere Teil war durch einen festgestampften Wattepfropf verschlossen. Jede Säule war mittels eines durchbohrten Gummistopfens auf einer kleinen Saugflasche aufgesetzt. Am oberen Rand der Säule befand sich ein zweifach gebogenes dünnes Glasröhrchen, das mit seinem freien Ende in ein Becherglas mit der Untersuchungslösung eintauchte (s. Abb.).



Als Adsorptionsmittel fanden Verwendung: Aluminiumoxyd, standardisiert nach Brockmann ³⁾, Aluminiumoxyd "Woelm" sauer und basisch ⁴⁾, Calciumcarbonat, chemisch rein, Kieselgur, ferner die Bleicherden Floridin XXF ⁵⁾, Frankonit ⁶⁾ und Tonsil.

Die Säulen wurden vor Inbetriebnahme mit Salzsäure, verdünntem Ammoniak und Wasser durchgewaschen. Von den 1%igen Huminsäurelösungen wurden jeweils 5 ml vorgelegt und mit dest. Wasser nachgewaschen,

-
- 1) W. Graßmann u. K. Hannig, Naturwissenschaften 37, 397 (1950); Hoppe-Seylers Z. 292, 32 (1952)
 - 2) Herrn Dipl. Chem. M. Schleyer, Max-Planck-Institut für Eiweiß- u. Lederforschung, München (Direktor Prof. Dr. W. Graßmann möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Versuche danken.
 - 3) E. Merck, Darmstadt
 - 4) M. Woelm, Eschwege
 - 5) H. Bensemann, Bremen
 - 6) Pfirsching Mineralwerke, Kitzingen

bis das ablaufende Filtrat farblos war.

Zur Elution fanden verdünnter Ammoniak, Lösungen von Natriumdiphosphat, -fluorid, Pyridin und Pyridin-Wasser-Mischungen Anwendung. Mit allen verwendeten Lösungen konnten jedoch nur unerhebliche Mengen an Huminsäuren eluiert werden.

Dünnschichtchromatographie: Die Technik ist annähernd die gleiche wie die der Papierchromatographie mit aufsteigendem Lösungsmittel. Als Träger dienten Glasplatten von 9 x 12 cm, auf die das Adsorbens im allgemeinen trocken in gleichmäßig dünner Schicht aufgebracht wurde. Lediglich Calciumcarbonat wurde vorher mit Wasser zu einem Brei angeteigt und nach dem Aufstreichen getrocknet. Die Huminsäurelösungen (5%ig) wurden auf eine 2 cm vom unteren Rand entfernte Startlinie aufgetropft. Die Platte kam leicht geneigt in eine Glasschale zu stehen, auf deren Boden sich das Fließmittel befand. Nachdem das Fließmittel im luftdicht abgeschlossenen Entwicklungsgefäß den oberen Plattenrand erreicht hatte, wurde die Platte herausgenommen und an der Luft getrocknet. Zur Fixierung wurden die Platten im Trockenschrank schräg in eine Schale mit geschmolzenem Paraffin gestellt. Das Paraffin stieg in der körnigen Schicht kapillar hoch und bildete mit dem Adsorbens nach dem Erkalten eine feste Schicht.

Als Fließmittel wurden 1 n Lösungen von Natriumdiphosphat, -carbonat, -fluorid, -chlorid, -salicylat, Ammoniak und Kalilauge sowie verschiedene Pufferlösungen verwendet. Von den untersuchten Adsorptionsmitteln, den gleichen wie bei der Säulenchromatographie, bewährte sich das Aluminiumoxyd "Woelm", sauer, am besten.

Spektrographische Untersuchungen

Messung im Bereich von 200 - 700 m μ : Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit dem Zeiß-Opton Spektralphotometer M4Q. Eine 100 mg organischer Substanz entsprechende Menge der Proben wurde in 10 ml 0,5%iger Natronlauge gelöst und mit dest. Wasser auf eine Konzentration von 0,001 % verdünnt.

Messung im Bereich von 1-15 μ : Für die Untersuchung stand ein Beckman IR-4-Spektralphotometer mit NaCl-Optik zur Verfügung. Mit diesem Gerät können Messungen im nahen und mittleren Infrarot durch-

geführt werden. Von den Präparaten wurde jeweils 1 mg mit 500 mg KBr vermischt und in einem Vibrator nach v. A r d e n n e staubfein zerkleinert. Aus dem Pulver wurde unter einem Druck von 200 kg/cm^2 der Preßling geformt.

Flockung durch Säure

Eine Lösung von 2 g Huminsäuren in 150 ml 0,5%iger Natronlauge wurde mit 1 m Phosphorsäure genau neutralisiert, in einen 200 ml Meßkolben überführt und mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Von dieser Ausgangslösung wurden jeweils 25 ml in einem Becherglas mit 1 m Phosphorsäure auf p_H 6,0 - 5,0 - 4,0 - 3,5 - 3,0 - 2,5 - 2,0 eingestellt. Nach eintägigem Stehen wurden die Ansätze zentrifugiert (3500 U/min; 30 min), das Abgeschiedene in vorbereitete Platin- oder Quarzschalen gespült, bei 105° konstant getrocknet und bei 550° verascht. Die fällbare organische Substanz errechnet sich aus der Differenz von Trockenrückstand und Glühverlust.

F. S c h r i f t t u m

- 1) B r e m n e r , J. M. und L e e s , H.: J. Agric. Sci. 39, 274 (1949).
- 2) F l a i g , W., S c h e f f e r , F. und K l a m r o t h , B.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 71, 33 (1955).
- 3) F o r s y t h , W. G. C.: J. Agric. Sci. 37, 132 (1946).
- 4) F u c h s , W.: Kolloid-Z. 52, 248 (1930).
- 5) F u c h s , W.: Z. Angew. Chem. 44, 111 (1931).
- 6) F u c h s , W.: Die Chemie der Kohle. Berlin: Springer 1931.
- 7) H e i n e n , O. L.: Beiträge zur Kenntnis der Huminsäuren. Dissertation Universität München 1937.
- 8) H o c k , A.: Bodenkunde u. Pflanzenernähr. 5, 1 (1937).
- 9) K a r r e r , P. und B o d d i n g - W i g e r , B.: Helv. chim. Acta 6, 817 (1923).
- 10) M a r s h a l l , G. E. und P a t n a i k , N.: Soil Sci. 75, 153 (1953).
- 11) M i n s s e n , H.: Mitt. Verein Förd. Moorkultur 335 (1907).
- 12) N e h r i n g , K. und S c h i e m a n n , R.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 57, 193 (1952).
- 13) P o t t e r a t , M. und M o t t i e r , M.: Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. 44, 192 (1953).
- 14) P u u s t j ä r v i , V.: Acta Agriculturae Scandinavica V, 257 (1955).
- 15) Q u e n t i n , K.-E.: Fund. baln.-bioclim. 1, 197 (1959).
- 16) S c h e f f e r , F. und W e l t e , E.: Landwirtsch. Forsch. 1, 81 (1950).
- 17) S c h e f f e r , F. und W e l t e , E.: Landwirtsch. Forsch. 1, 190 (1950).
- 18) S c h e f f e r , F., Z i e c h m a n n , W. und S c h l ü t e r , H.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 70, 260 (1955).
- 19) S c h l i c h t i n g , E.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 61, 193 (1953).
- 20) S c h o b i n g e r , U.: Chemische Untersuchungen über die Umwandlung von Weizenstrohlignin im Laufe der Verrottung. Dissertation E.T.H. Zürich 1958.

- 21) S i m o n , K.: Z. Pflanzenernähr., Düng. Bodenkunde A 18, 323 (1930); - 1(46), 257 (1936); - Prakt. Blätter f. Pflanzenbau. u. -schutz XII, 362 (1935).
- 22) S o u c i , S. W.: Die Chemie des Moores. Stuttgart: Enke 1938.
- 23) S o u c i , S. W. und G e i s , F.: Brennstoff-Chem. 22, 25 (1941).
- 24) S p r i n g e r , U.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde XI, 313 (1928).
- 25) S p r i n g e r , U.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 34, 1 (1934).
- 26) S p r i n g e r , U.: Bodenkunde u. Pflanzenernähr. 6(51), 312 (1938).
- 27) S p r i n g e r , U.: Bodenkunde u. Pflanzenernähr. 18, 129 (1940).
- 28) S p r i n g e r , U.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 82, 205 (1958).
- 29) T h i e l e , H. und K e t t n e r , H.: Kolloid-Z. 130, 131 (1953).
- 30) W e l t e , E.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 56, 105 (1952).
- 31) W e l t e , E.: Z. Angew. Chem. 67, 153 (1955).

G. A n h a n g : Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Ausgangsmaterial

Nr.		Fundort	Zusammensetzung		
			Wasser %	Mineral- stoffe %	organ. Stoffe %
I	Hochmoortorf Sphagnum-Torf	Kayhauser Moor bei Zwischenahn/Nds.	88,30 (13,07) ⁺	0,18	11,52
II	Hochmoortorf Sphagnum-Eriophorum-T.	Lager bei Einbeck/Nds.	11,23 ⁺	2,79	85,98
III	Zwischenmoortorf Sphagnum-Carex-Torf	Roth Filz bei Holzhausen/Obb.	91,09	0,28	8,63
IV	Zwischenmoortorf Carex-Sphagnum-Torf	Breitenmoos bei Reichenhall/Obb.	29,26 ⁺	8,23	62,51
V	Flachmoortorf Carex-Torf	Schweinfilz bei Aibling/Obb.	84,22	2,36	13,42
VI	Waldmoortorf	Lager bei Steben/Ofr.	81,62	4,69	13,69
VII	Moorerde	Lager bei Lambach/Oö.	17,30 ⁺	22,23	60,47
VIII	Holzmoder	Kochelberg bei Garmisch/Obb.	11,95 ⁺	-	-
IX	Braunkohle Kassler Braun U 822	W. Urban GmbH. Frielendorf/Hess.	23,42 ⁺	10,11	66,47
X	Braunkohlenrohhumus	"Humussäure Riedel de Haen" - nach Auskunft der Firma hergestellt aus B. durch Extrak- tion mit Soda und Fällung mit Salzsäure.			

+ lufttrocken

Tabelle 2: Ausbeute an Huminsäuren (fünffache Extraktion)

Ausgangsmaterial	Huminsäuren, bezogen auf Trockenmasse des Ausgangsmaterials - bei Extraktion mit		
	NaOH %	Na ₄ P ₂ O ₇ %	NaF %
Hochmoortorf (I)	26,22	7,74	2,31
Hochmoortorf (II)	17,63	-	0,53
Zwischenmoortorf (III)	38,59	14,70	6,84
Zwischenmoortorf (IV)	15,80	5,19	2,07
Flachmoortorf (V)	37,83	19,69	5,54
Waldmoortorf (VI)	31,17	13,89	10,96
Moorerde (VII)	44,54	44,69	33,65
Braunkohle (IX)	71,59	-	46,91
Holzmoder (VIII)	23,73	3,74	Spuren

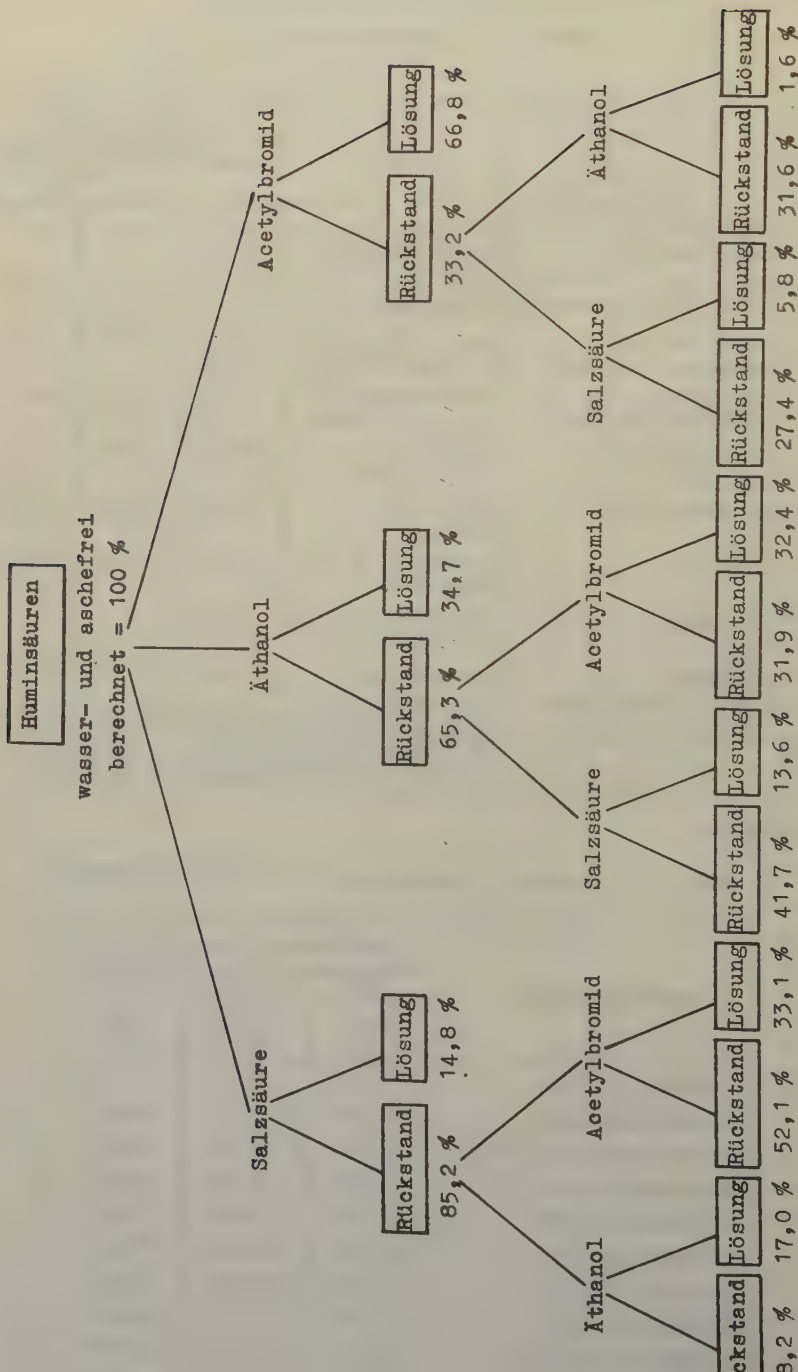


Abbildung 1

Mehrstufige Reinigung

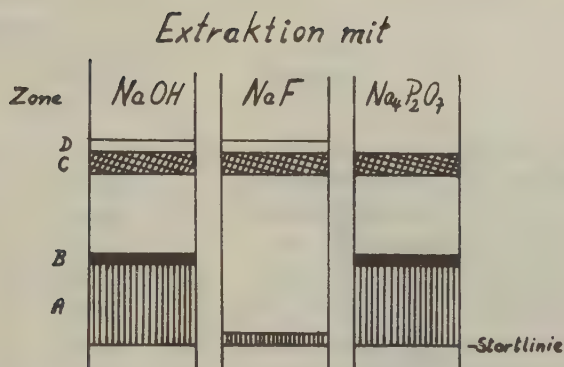


Abbildung 2

Pherogramme der mit verschiedenen Extraktionsmitteln aus Moor-
erde (VII) isolierten Huminsäuren (schematische Darstellung)

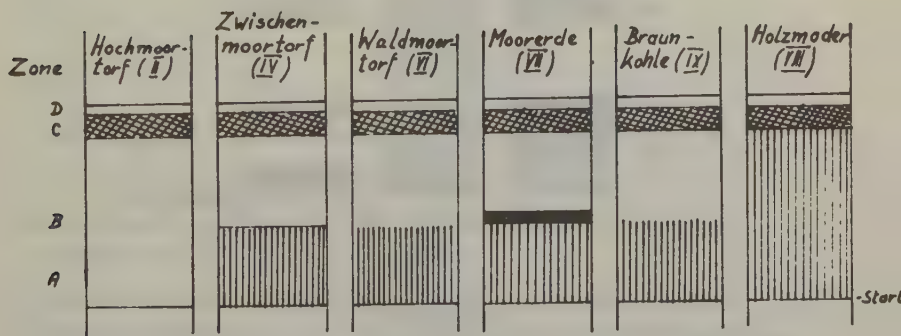


Abbildung 3

Pherogramme von Huminsäuren aus verschiedenem Ausgangsmaterial
(Natronlauge)

Tabelle 3: Löslichkeit von Huminsäuren in Alkohol
(Humussäuren, Hymatomelansäuren)

	Herkunft	in Alkohol	
		löslich (Hymatome- lansäuren) %	unlöslich (Humussäu- ren) %
Huminsäuren	Hochmoortorf (II)	40,44	59,56
"	Zwischenmoortorf (IV)	43,06	56,94
"	Mooreerde (VII)	26,35	73,65
"	Braunkohle (IX)	43,46	56,54
"	Riedel de Haën (X)	50,60	49,40
Humoligninsäuren	Holzmoder (VIII)	23,43	76,57
Braunhuminsäuren	Mooreerde (VII)	40,46	59,54
Grauhuminsäuren	"	Spuren	100,00

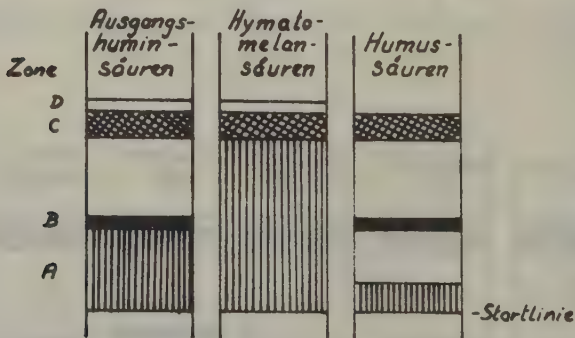


Abbildung 4

Pherogramme von Humussäuren und Hymatomelansäuren im Vergleich zu den Ausgangshuminsäuren (schematische Darstellung).

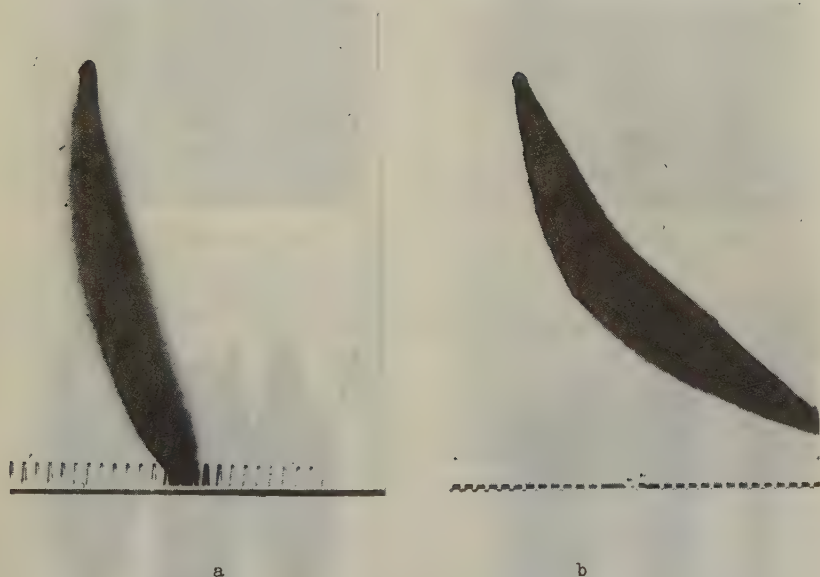


Abbildung 5

Hochspannungs-Vertikalelektrophorese von Huminsäuren aus Moor-
erde (VII)

- a) Papier Schleicher & Schüll Nr. 2040a; 280 V/28 mA; Veronal-Salzsäure-Puffer p_H 8,7 (1/15 molar).
- b) Papier Schleicher & Schüll Nr. 2040a; 720 V/26 mA; Pyridin-Essigsäure-Puffer p_H 4,9 (80 ml Eisessig, 100 ml Pyridin mit Aqua dest. auf 30 l aufgefüllt).

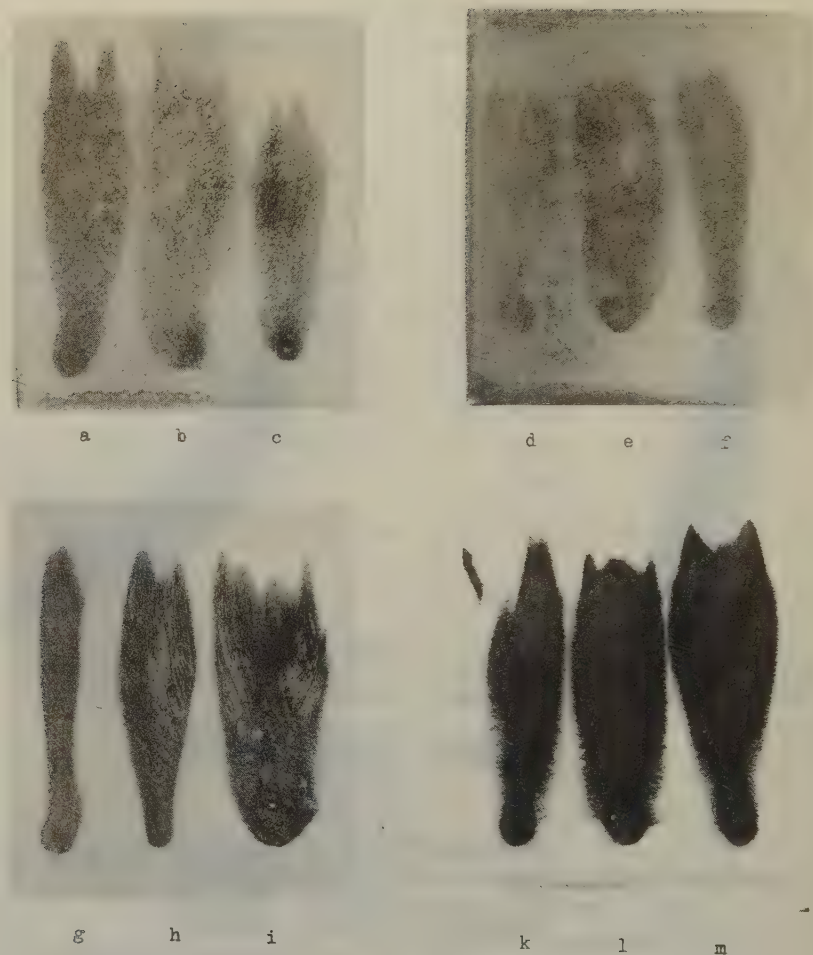


Abbildung 6

Plattenchromatogramme verschiedener Huminsäuren und Huminsäurefraktionen

Huminsäuren aus: a) Braunkohle (IX); b) Zwischenmoortorf (IV); c) Hochmoortorf (II); d) Holzmoder (VIII); e) Zwischenmoortorf (IV); f) Hochmoortorf (II); g) Grauhuminsäuren (VII); h) Moorerde (VII); i) Braunhuminsäuren (VII); k) Hymatomelansäuren (X); l) Huminsäuren Riedel de Haën (X); m) Humussäuren (X).

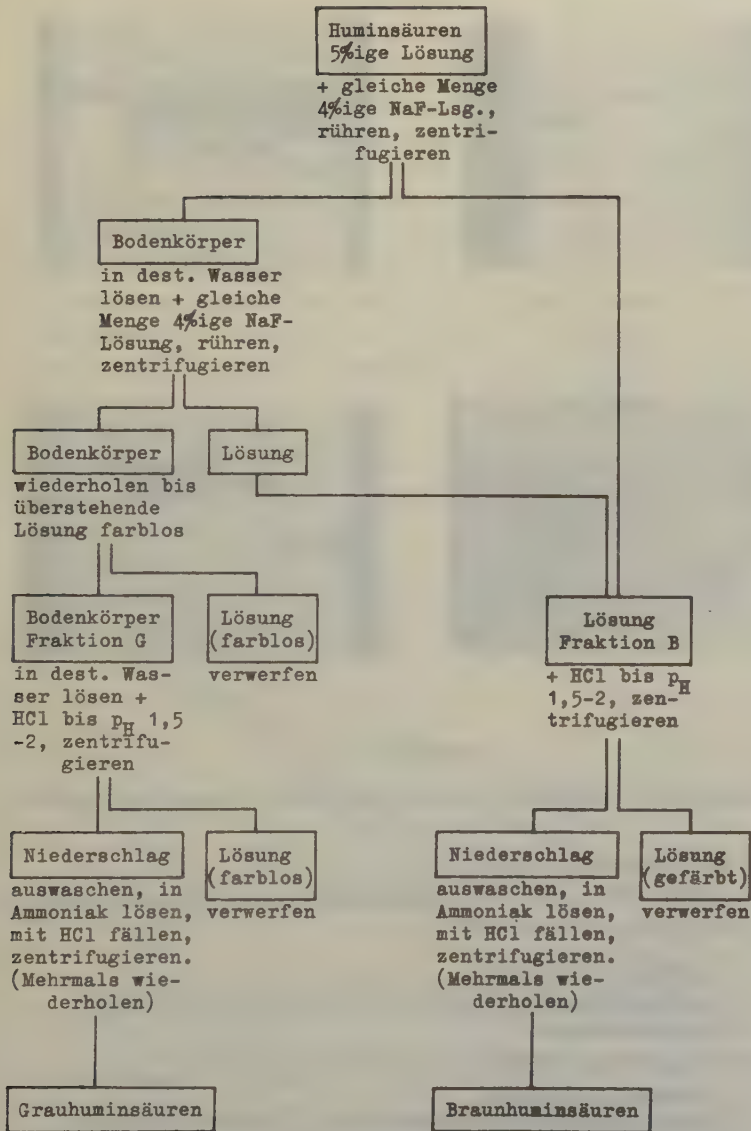


Abbildung 7

Schema der Fraktionierung mit Natriumfluorid

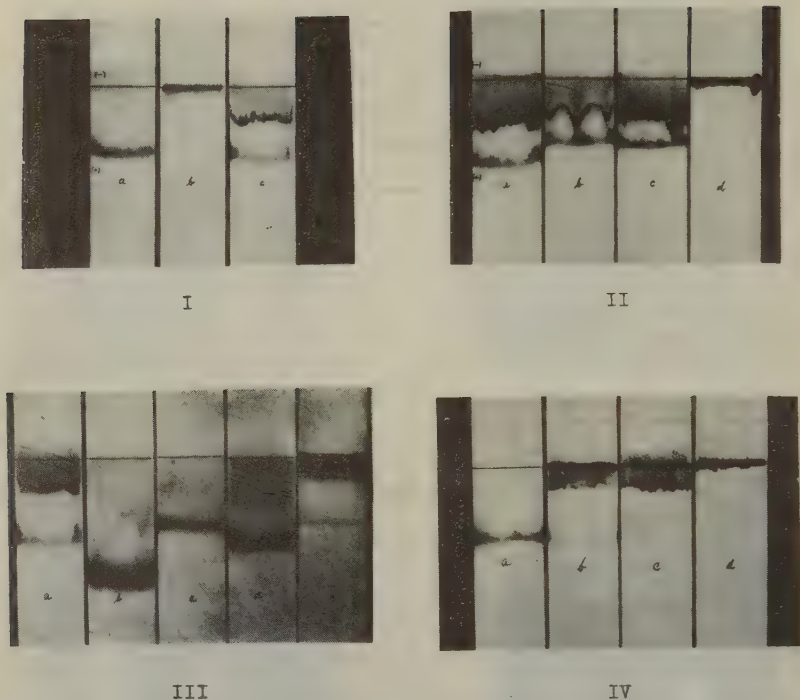


Abbildung 8

Pherogramme von Braun- und Grauhuminsäurefraktionen aus Moorerde

I. Fraktionierung mit NaF:

- a) Braunhuminsäuren; b) Grauhuminsäuren; c) Ausgangshuminsäuren.

II. Fraktionierung mit NaOH:

- a) Ausgangshuminsäuren;
- b) Braunhuminsäurefraktion nach der 1. Fällung mit NaOH;
- c) Braunhuminsäurefraktion nach der 2. Fällung mit NaOH;
- d) Grauhuminsäuren.

III. Fraktionierung mit NaCl:

- a) Ausgangshuminsäuren;
- b) Braunhuminsäurefraktion nach der 1. Fällung mit NaCl;
- c) Braunhuminsäurefraktion nach der 2. Fällung mit NaCl;
- d) Braunhuminsäurefraktion nach der 3. Fällung mit NaCl;
- e) Grauhuminsäurefraktion.

IV. Wanderungsbeeinflussung der Grauhuminsäuren durch Zusätze:

- a) Braunhuminsäuren; b) Grauhuminsäuren, nach Zusatz von Braunhuminsäuren (a); c) Grauhuminsäuren, nach Zusatz von Lignin; d) Grauhuminsäuren.

Tabelle 4: Zusammensetzung von Huminsäuren und Huminsäurefraktionen

Bezeichnung	Herkunft	Asche %	organische Substanz			
			C %	H %	N %	S %
Huminsäuren	Hochmoortorf (II)	0,68	56,57	4,97	1,42	0,47
Huminsäuren	Zwischenmoortorf (IV)	1,36	55,21	4,77	2,36	0,38
Huminsäuren	Moorerde (VII)	2,69	57,13	3,55	2,90	0,43
Huminsäuren	Braunkohle (IX)	3,61	60,30	4,36	1,93	0,58
Huminsäuren	Riedel de Haën (X)	4,35	59,61	4,71	1,40	0,28
Humolignins.	Holzmoder (VIII)	0,30	61,45	-	1,12	0,07
Hymatomelans.	Riedel de Haën (X)	2,15	59,45	5,14	3,30	0,19
Humussäuren	" " "	5,43	63,14	4,41	1,07	0,26
Braunhumins.	Moorerde (VII)	3,42	56,74	4,01	1,63	0,56
Grauhumins.	"	1,39	62,61	3,02	1,52	0,20

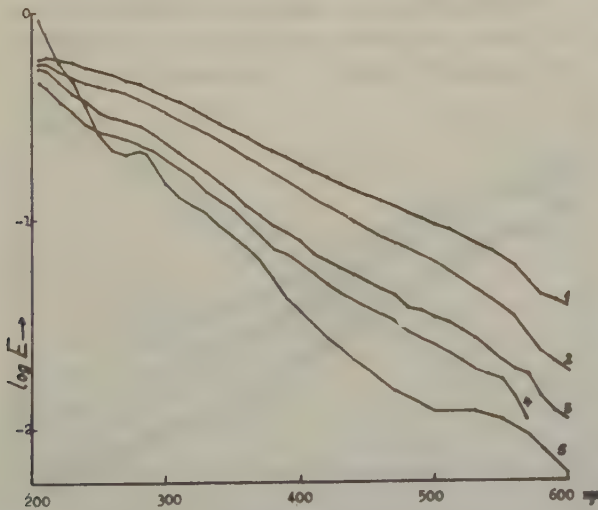


Abbildung 9

Absorptionsspektren von Huminsäuren aus verschiedenem Ausgangsmaterial (Natronlauge)

1 = Moorerde (VII); 2 = Braunkohle (IX); 3 = Zwischenmoortorf (IV);
4 = Hochmoortorf (II); 5 = Holzmoder (VIII).

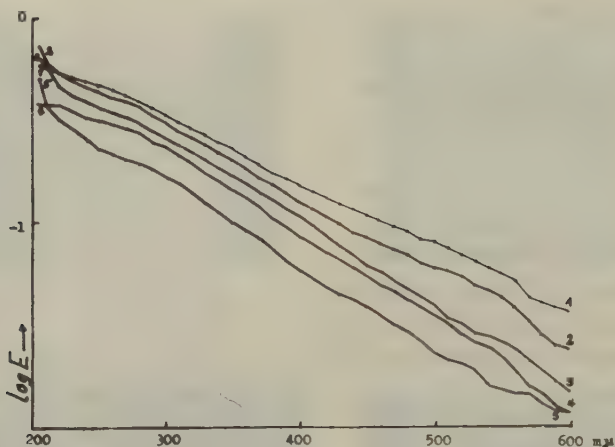


Abbildung 10: Absorptionsspektren von Huminsäuren aus verschiedenem Ausgangsmaterial (Natriumfluorid)

1 = Moorerde (VII); 2 = Zwischenmoortorf (IV); 3 = Hochmoortorf (II);
4 = Braunkohle (IX); 5 = Flachmoortorf (V).

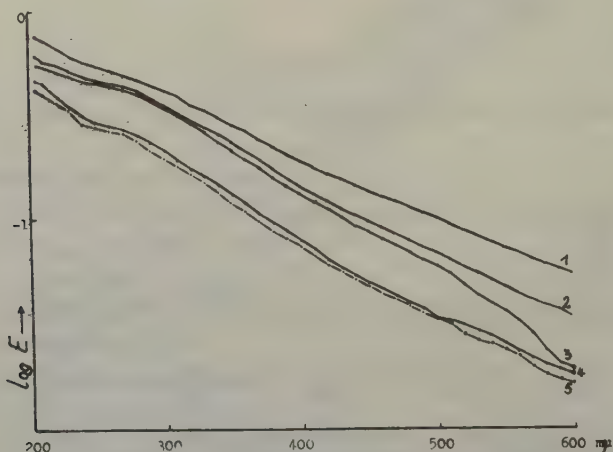


Abbildung 11: Absorptionsspektren von Huminsäuren aus verschiedenem Ausgangsmaterial (Soda, p_H 7,5)

1 = Moorerde (VII); 2 = Braunkohle (IX); 3 = Riedel de Haën (X);
4 = Hochmoortorf (II); 5 = Zwischenmoortorf (IV).

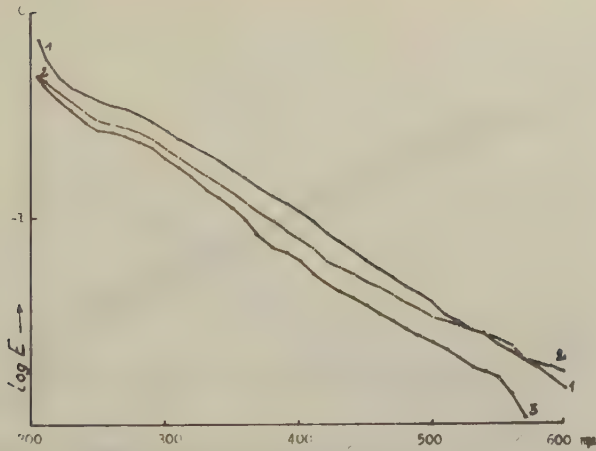


Abbildung 12: Absorptionsspektren von Huminsäuren aus Hochmoortorf (II); (Einfluß des Extraktionsmittels)

1 = Natriumfluorid; 2 = Soda, p_H 7,5; 3 = Natronlauge.

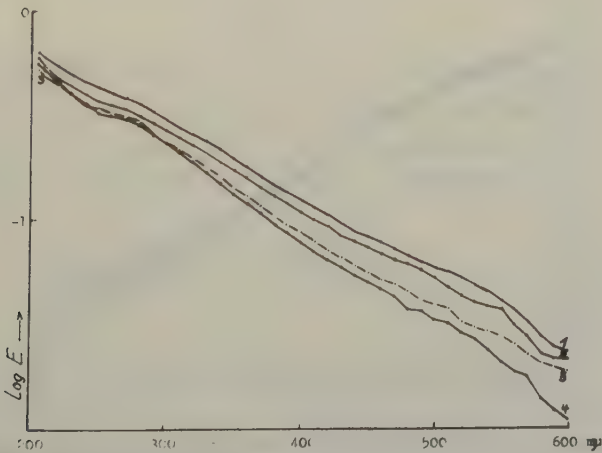


Abbildung 13: Absorptionsspektren von Huminsäuren aus Zwischenmoortorf (IV); (Einfluß des Extraktionsmittels)

1 = Natriumfluorid; 2 = Natriumdiphosphat; 3 = Soda, p_H 7,5;
4 = Natronlauge.

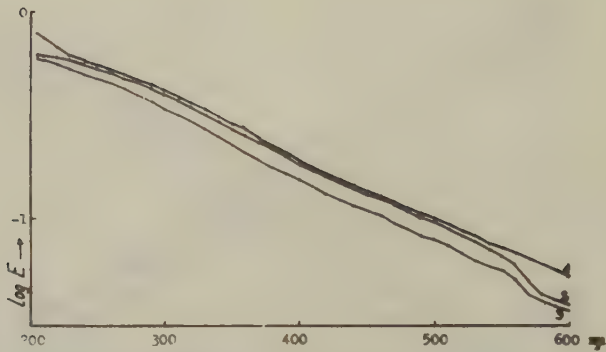


Abbildung 14: Absorptionsspektren von Huminsäuren aus Moorerde (VII);
(Einfluß des Extraktionsmittels)
1 = Soda, p_H 7,5; 2 = Natronlauge; 3 = Natriumfluorid.

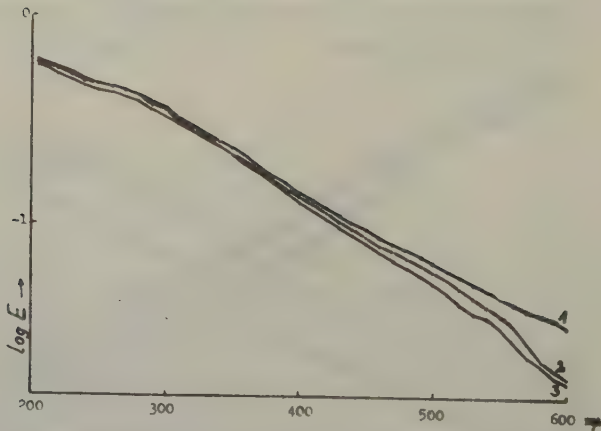


Abbildung 15: Absorptionsspektren von Huminsäuren aus Braunkohle (IX)
(Einfluß des Extraktionsmittels)
1 = Soda, p_H 7,5; 2 = Natronlauge; 3 = Natriumfluorid.

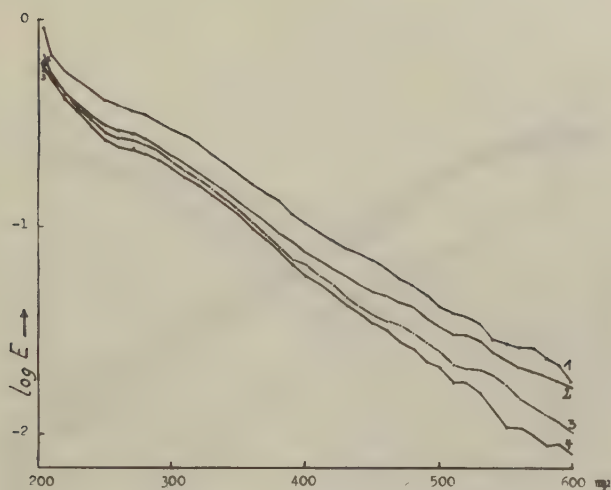


Abbildung 16

Absorptionsspektren von Huminsäuren aus Flachmoortorf (V);

1 = isoliert mit Natriumfluorid; 2 = isoliert mit Natriumdiphosphat;

3 = isoliert aus dem Rückstand von 1 mit Natronlauge;

4 = isoliert aus dem Rückstand von 2 mit Natronlauge.

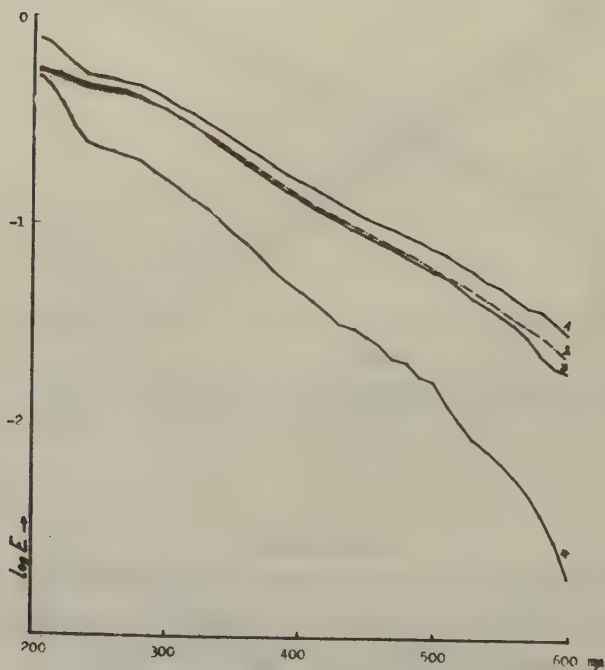


Abbildung 17

Absorptionsspektren verschiedener Fraktionen aus "Humussäure
Riedel de Haën" (X);

1 - Alkoholunlösliche Fraktion (Humussäuren); 2 - Hydrolysenrück-
stand; 3 - Ausgangshuminsäuren; 4 - Alkohollösliche Fraktion (Hy-
matomelansäuren).

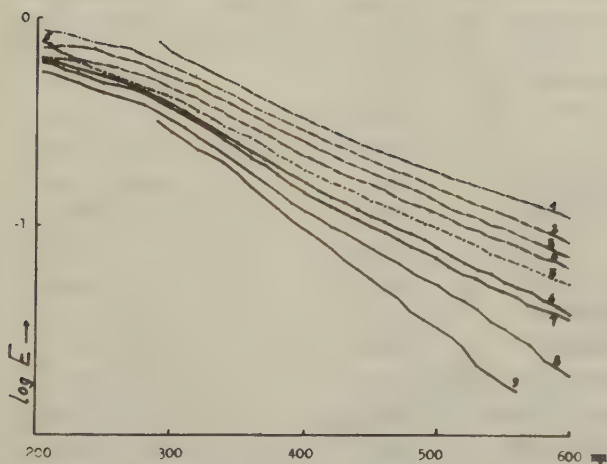


Abbildung 18

Absorptionsspektren von Grau- und Braunhuminsäuren aus Moorerde

Grauhuminsäuren: 1 = Eluat der grauschwarzen Phero-grammzone B;
2 = gewonnen durch Fraktionierung mit 2 % NaF; 3 = gewonnen durch
Fraktionierung mit 2 n NaOH; 4 = gewonnen durch Fraktionierung
mit 2 n NaCl; 5 = Ausgangshuminsäuren.

Braunhuminsäuren: 6 = gewonnen durch Fraktionierung mit 2 n NaOH;
7 = gewonnen durch Fraktionierung mit 2 n NaCl; 8 = gewonnen
durch Fraktionierung mit 2 % NaF; 9 = Eluat der braunen Phero-
grammzone C.

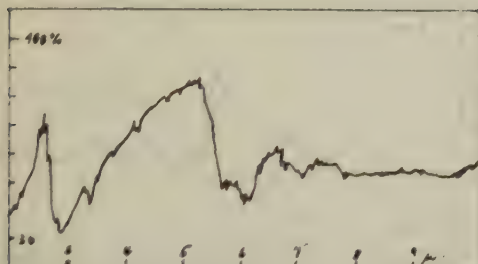
Tabelle 5: Farbquotienten von Huminsäuren

Ausgangsmaterial bzw. Huminsäurefraktion	Extrak- tions- mittel	Zahl d. Extrak- tionen	Farbquotient mp		
			300/500	250/550	470/660
Grauhuminsäuren (VII)	+	-	3,0	6,4	3,2
Moorerde (VII)	Na_2CO_3	2	4,15	7,7	-
"	NaOH	5	4,17	8,0	3,45
"	NaF	5	4,28	8,35	3,5
Zwischenmoortorf (IV)	NaF	5	5,1	10,2	3,7
"	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	5	5,1	9,8	3,55
Braunkohle (IX)	Na_2CO_3	2	5,2	10,0	3,95
Humussäuren (X)	-	-	5,3	10,4	5,36
Braunkohle (IX)	NaOH	5	5,55	11,5	5,5
Hydrolysenrückstand (X)	-	-	5,85	11,7	7,0
Hs. Riedel de Haën (X)	Na_2CO_3	-	5,9	12,4	6,1
Hochmoortorf (II)	NaF	5	6,0	12,9	6,5
Zwischenmoortorf (IV)	Na_2CO_3	2	6,0	12,0	4,45
Braunhuminsäuren (VII)	+	-	6,2	13,7	7,0
Zwischenmoortorf (IV)	Na_2CO_3	5	6,25	12,9	6,9
Hochmoortorf (II)	Na_2CO_3	2	6,45	11,7	3,5
Braunkohle (IX)	NaF	5	6,55	14,3	8,3
Flachmoortorf (V)	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	5	6,6	13,35	4,9
Zwischenmoortorf (IV)	NaOH	5	6,8	15,7	5,4
Flachmoortorf (V)	NaF	5	7,1	15,0	5,9
Hochmoortorf (II)	NaOH	5	7,7	14,8	32,0
Flachmoortorf (V) ++)	NaOH	5	8,1	16,5	7,25
" +++)	NaOH	5	9,0	23,6	9,3
Hymatomelansäuren (X)	-	-	9,35	32,7	-
Holzmoder (VIII)	NaOH	5	12,1	23,5	-

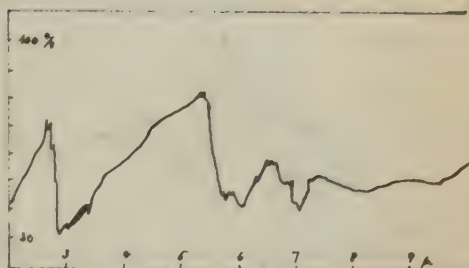
+) Fraktioniert mit NaF

++) Rückstand von der Natriumfluoridextraktion

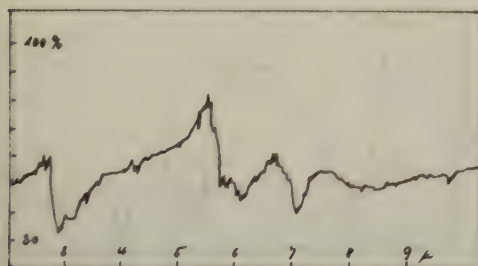
+++) Rückstand von der Natriumdiphosphatextraktion



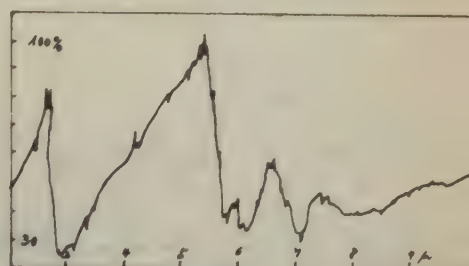
Hochmoortorf (II)



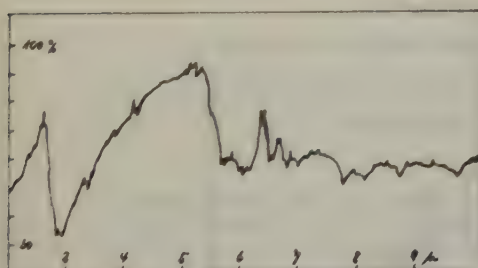
Zwischenmoortorf (IV)



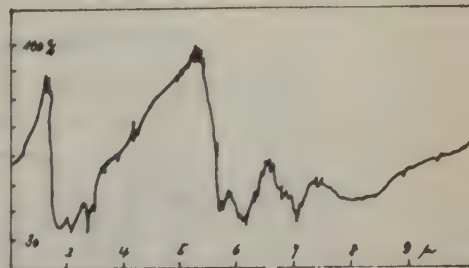
Moorerde (VII)



Braunkohle (IX)



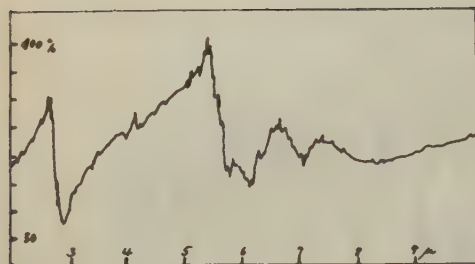
Holzmoor (VIII)



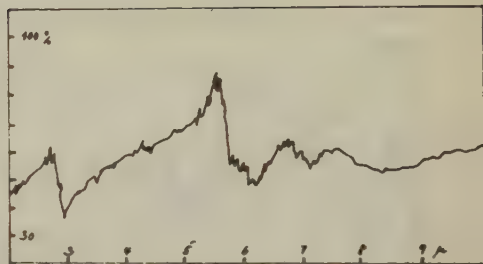
Riedel de Haën (X)

Abbildung 19

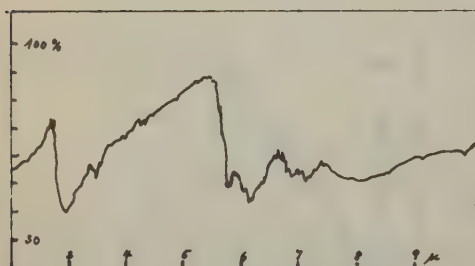
Infrarot-Spektren von Huminsäuren aus verschiedenem Ausgangsmaterial



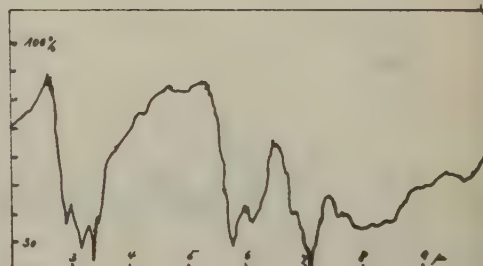
Braunhuminsäuren



Grauhuminsäuren



Humussäuren



Hymatomelansäuren

Abbildung 20
Infrarot-Spektren von Huminsäurefraktionen

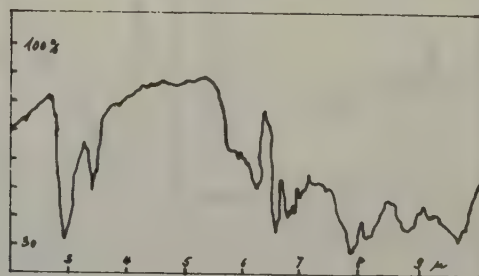


Abbildung 21
Infrarot-Spektrum des Lignins

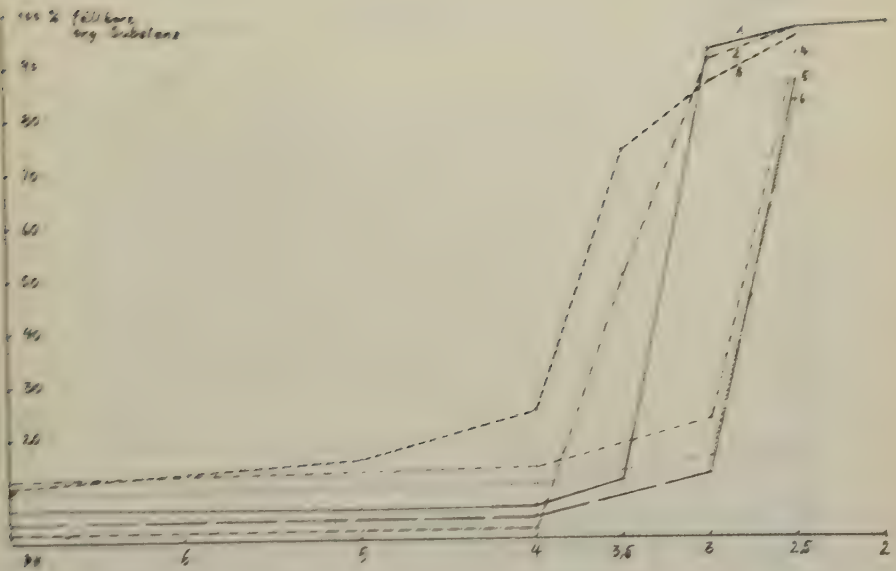


Abbildung 22

Extraktion von Huminstoffen aus verschiedenen Torfprobenmaterial
in Abhängigkeit vom pH-Wert

1 = Krauttorf (IX); 2 = Moortorf (VII); 3 = Holzmoor (VIII);
4 = Kiefernmoortorf (IV); 5 = Bettel de Paer (X); 6 = Moortorf (II)

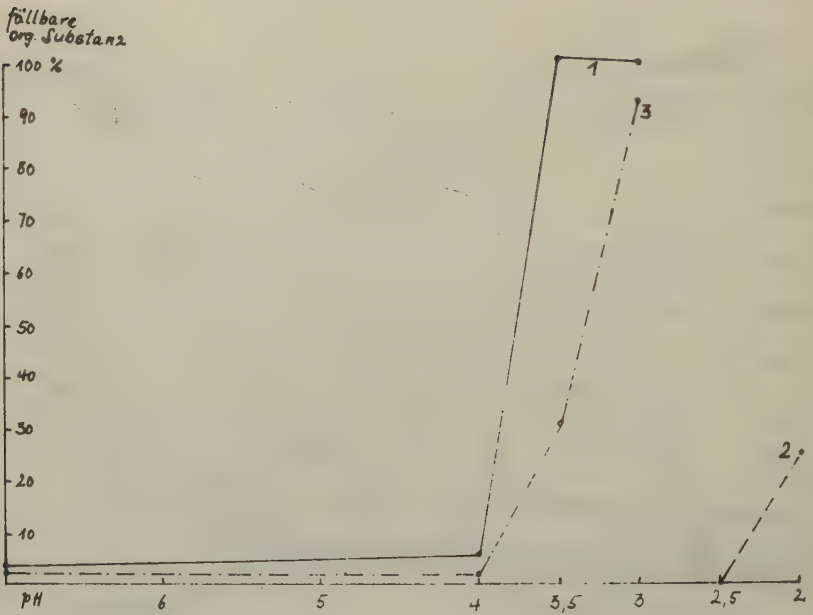


Abbildung 23

Flockung von Huminsäurefraktionen in Abhängigkeit vom p_H -Wert

1 = Grauhuminsäuren; 2 = Braunhuminsäuren; 3 = Humussäuren.

L e b e n s l a u f

Am 25. Oktober 1929 bin ich, Hans-Elmar Bisle, als Sohn des Studienrats Richard Bisle und seiner Ehefrau Ellen, geb. Laubmeyer in Bremerhaven geboren. Dort besuchte ich von Ostern 1936 bis Ostern 1939 die Volksschule und von Ostern 1939 bis Februar 1941 die Bürgermeister-Smidt-Oberschule. Von Februar 1941 bis Juli 1942 besuchte ich die Oberschule in Meidenheim a. d. Brenz, von August 1942 bis März 1945 wieder die Bürgermeister-Smidt-Oberschule in Bremerhaven und ab Dezember 1945 die Oberschule a. d. Hallstraße in Augsburg, wo ich im Juli 1948 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Wintersemester 1948/49 an studierte ich drei Semester an der Philosophischen Hochschule St. Stephan in Augsburg, bis ich mit Beginn des Sommersemesters 1950 zum Studium der Lebensmittelchemie an der Universität München zugelassen wurde. Während des Studiums praktizierte ich je einen Monat in der lebensmittelchemischen und der bakteriologischen Abteilung des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven. Im Juli 1953 legte ich in München die Vorprüfung und im Juni 1955 die Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker ab. Von August 1955 bis Februar 1959 führte ich die vorliegende Arbeit an der Chemischen Abteilung des Zoologischen Instituts bei der Universität München und an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie durch.

Seit dem 1. März 1959 bin ich als Lebensmittelchemiker in einer Feinkostfabrik tätig.

